

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL LINFOMA DE LA ZONA
MARGINAL GANGLIONAR

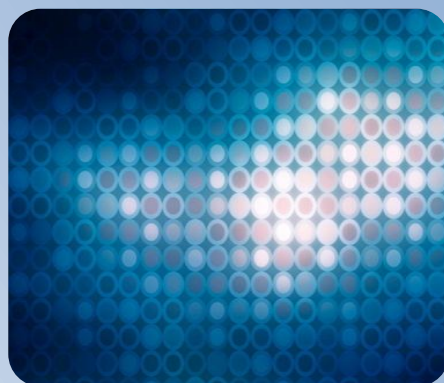
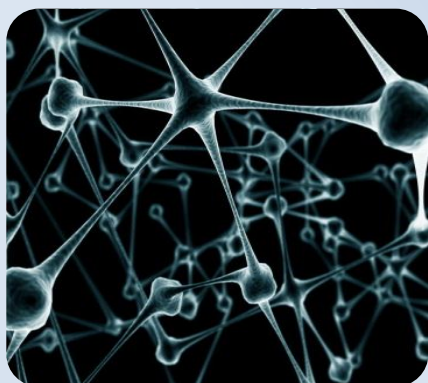
TESIS DOCTORAL DE:

JESÚS ALBERTO ARRIBAS CARMENA

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

**MANUELA MOLLEJO VILLANUEVA
MIGUEL ÁNGEL PIRIS PINILLA**

Madrid, 2013



**UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
DE MADRID**

FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR I

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL LINFOMA DE LA ZONA MARGINAL GANGLIONAR

TESIS DOCTORAL

J. ALBERTO ARRIBAS CARMENA

ENERO 2013



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR I



CARACTERIZACIÓN MOLECULAR
DEL
LINFOMA DE LA ZONA MARGINAL GANGLIONAR

Doctorando:

J. Alberto Arribas Carmena

Directores:

Dra. Manuela Mollejo Villanueva

Dr. Miguel Ángel Piris Pinilla

Director-tutor:

Dr. Guillermo Velasco Díez

Enero 2013



Toledo 28 de Enero de 2013

Dr. Miguel Angel Piris Pinilla, Jefe de Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Marqués de Valdecilla y Director Científico del IFIMAV, Santander.

Dra Manuela Mollejo Villanueva, Médico especialista de área de Anatomía Patológica del Hospital Virgen de la Salud, Toledo.

CERTIFICAN que:

D. Jesús Alberto Arribas Carmena ha realizado bajo nuestra dirección la tesis doctoral cuyo título es **“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL LINFOMA DE LA ZONA MARGINAL GANGLIONAR”**, que a nuestro juicio reúne plenamente los requisitos necesarios para optar al Grado de Doctor, siendo tutor de la tesis el Dr Guillermo Velasco Díez, Profesor Asociado del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid.

Esta tesis representa un trabajo original que ha dado lugar a publicaciones relevantes en revistas internacionales de alto índice de impacto, ofreciendo el estudio molecular más detallado sobre los linfomas de la zona marginal ganglionar actualmente descritos.

Las aportaciones principales de su trabajo han sido:

- Confirmar las células B de la zona marginal como origen celular de estos tumores.
- Firma de expresión génica y de miRNA de los linfomas de la zona marginal ganglionar.
- Marcadores para el diagnóstico diferencial con el linfoma folicular

Y para que conste, firmamos el presente certificado

Fdo. Dra Manuela Mollejo Villanueva

Fdo. Dr Miguel Angel Piris Pinilla

"Si he conseguido ver más lejos, es porque me he aupado en hombros de gigantes"

Isaac Newton

A mis padres

A Conchi

Me gustaría dejar constancia en este texto de mi más sincero agradecimiento a toda una serie de personas sin cuya aportación y ayuda la elaboración de esta tesis no hubiese sido posible.

En primer y obligado lugar, gracias a la Dra. Manuela Mollejo, directora de esta tesis. Gracias por brindarme la oportunidad de dedicarme profesionalmente a la investigación y gracias por hacerme avanzar en la dirección correcta. Su intachable buen hacer profesional ha trazado siempre el camino a seguir en mi trayectoria como biólogo. La confianza, en ocasiones defraudada, depositada en mis capacidades y los consejos y enseñanzas recibidos, me han hecho mejorar tanto en el ámbito profesional como en el personal. Gracias de corazón.

Al Dr. Miguel Ángel Piris, también director de esta tesis. Su enorme calidad como investigador hace que estar bajo su tutela sea, además de todo un honor, un privilegio abrumador. La ocasión de haber podido conocer, aprender y trabajar con él y con su equipo de investigación, poniendo a mi disposición medios y recursos de primerísimo nivel, es inestimable. Gracias.

Gracias a todo el Servicio de Genética del Hospital Virgen de la Salud de Toledo, donde he aprendido en qué consiste un laboratorio de biología molecular, en su concepción más amplia. Gracias a Pedro Martínez, jefe de servicio, por permitirme llevar a cabo mi trabajo en las instalaciones del servicio, y por la miel. A la Dra. Patrocinio Algara por enseñarme Genética y decirme alguna que otra verdad. A la Dra. Elena Ruiz-Ballesteros, por acordarse de mí antes de empezar en esto y por permitirme seguir sus pasos. A las Dras. Yolanda Ruano y Elisa Pérez, a la primera por enseñarme los entresijos del excel, a la segunda por hacerme cumplir algunos plazos, y a las dos por las incontables horas juntos en el rincón del becario. A la Dra. Yolanda Campos por ser mi profesora particular de inmunología. A la Dra. Marisol Mateo, por sus cromosómicas correcciones. A la Dra. Bárbara Meléndez por su saber científico. A Yolanda Vicente por ser mi primera maestra en el laboratorio. A Carmen Granda por resolverme no pocas dudas y a Gema Pérez por su adorable mal humor. A Alicia por sus citas y favores. A Sonsoles, Vanesa y Noe por sus PCRs. A Pili por su agradable simpatía. A Paco, Carles y Pedrulo por su saber deportivo. A Fermina por sus canciones entre dientes y a Chelo por tener siempre la sonrisa presta. En definitiva, gracias a tod@s por las experiencias vividas en común.

El equipo humano que dirige el Dr. Piris, primero en el CNIO de Madrid y ahora en el Instituto IFIMAV de Santander, todos de incuestionable valía personal y profesional, son también merecedores de mi gratitud. Ellos me han dado la oportunidad de aprender y mejorar mucho en mi trabajo. Ha sido un verdadero placer aprender de la Dra. Nerea Martínez, y de la Dra. Margarita Sánchez-Beato ahora en el Hospital Univ. Puerta de Hierro-Majadahonda. Gracias también a la Dra. Cristina Gómez-Abad, parte del trabajo de esta tesis es suyo. Por su

soporte técnico gracias a Beatriz Sánchez-Espiridón, Gonzalo Gómez, M^a Elena Rodríguez, Lorena DiLisio y Laura Cereceda. Gracias también a Raquel Villuendas, aunque ya no esté entre nosotros.

Gracias igualmente a los componentes del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Virgen de la Salud de Toledo. Además de Manuela, han compartido conmigo su experiencia y su conocimiento los jefes de servicio, el anterior, Carlos Rubio, y el actual, Rufo Rodríguez-Merlo, Juan Luis, Javier, Esperanza, Marta, Raquel, Rocío, todos los residentes y Ángel (el secretario). Gracias también a la pericia técnica de Elena, Javi e Irene. A Fani, ahora en el Hospital Univ. de Getafe y a los que ya se han ido.

Al Dr. Guillermo Velasco, tutor de esta tesis, por su participación en el desarrollo de este trabajo y por su cercanía, gracias.

Quiero dedicar esta tesis a mis padres, por enseñarme a vivir, apoyarme en mis errores y comprenderme en mis decisiones, las buenas y las otras; y a mis hermanos, por compartir su vida conmigo. Gracias por ser mi familia. Y a mis suegros y a mis cuñados, por su ayuda y por su interés en este trabajo y por ser también mi familia. Además, me gustaría tener un recuerdo especial para mis abuelos, que seguro estarían orgullosos.

Por último, y con todo mi corazón, quiero dedicar especialmente esta tesis a mi pequeña gran familia. A mis pequeños, por hacerme olvidar los malos momentos, y a mi mujer Conchi, porque ella es el soporte que me mantiene de pie cuando todo lo demás ha caído. Sin ella no hubiese llegado al final de este camino. Gracias por tu apoyo, tu ánimo, tu comprensión y tu cariño. Gracias por estar siempre a mi lado. Y a ti que vienes en camino, también.

La financiación para la elaboración de esta Tesis Doctoral proviene de la Fundación para la Investigación Sanitaria del Ministerio de Educación y Ciencia, a través del proyecto de investigación FIS PI08/1666; de la Fundación para la Investigación Sanitaria de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, a través del proyecto de investigación FISCAM PI2008/31; y del Servicio de Salud de Castilla-La Mancha.



ÍNDICE

ÍNDICE

	Página
ABSTRACT	13
INTRODUCCIÓN	17
1.- El linfoma de la zona marginal en la clasificación de los linfomas	17
2.- La zona marginal normal (ZMn)	18
3.- Linfoma de la zona marginal ganglionar (LZMG)	19
3.1.-Manifestaciones clínicas	20
3.2.-Morfología	21
3.3.-Inmunofenotipo	21
3.4.-Alteraciones moleculares	21
3.5.-Hipermutación somática	22
3.6.-Estimulación antigénica crónica	23
3.7.-Diagnóstico diferencial	23
3.8.-Factores con valor pronóstico	25
3.9.-Tratamiento	26
4.- Microarrays en el estudio de perfiles de expresión	26
4.1.-Perfil de expresión génica en linfomas	28
5.- MicroRNAs	30
5.1.-Procesamiento y mecanismo de silenciamiento génico	31
5.2.-MiRNAs y célula B	32
5.3.-MiRNAs y linfoma	33
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	39
MATERIAL Y MÉTODOS	43
1.- Procedencia de las muestras	43
1.1.-Muestras para estudios moleculares	43
1.2.-Muestras para validación	43
1.3.-Muestras para selección de células B	43
2.- Pacientes	44
3.- Metodología	44
3.1.-Selección de células B	44
3.2.-Extracción de ADN y ARN	45
3.3.-Estudios de expresión génica por microarrays de ADNc	45
3.4.-Estudio del perfil de miRNAs por microarrays	46
3.5.-Análisis del Número de Copias (ANC) por microarrays de CGH	47
3.6.-Análisis de datos de microarrays: expresión génica, miRNAs y ANC	48
3.7.-Validación por PCR cuantitativa a tiempo real qRT-PCR	51
3.8.-Inmunohistoquímica	52

RESULTADOS	57
1.- Caracterización molecular del linfoma de la zona marginal ganglionar (LZMG)	57
1.1.-Perfil de expresión génica por microarrays de ADNc	57
1.2.-Perfil de miRNAs por microarrays	62
1.3.-Análisis de Número de Copias (ANC) por microarrays de CGH en LZMG	63
2.- Diagnóstico diferencial del LZMG frente al Linfoma Folicular (LF)	68
2.1.-Genes diferencialmente expresados entre LZMG y LF por microarrays de ADNc	68
2.2.-MiRNAs diferencialmente expresados entre LZMG y LF por microarrays	70
3.- Diagnóstico diferencial frente al Linfoma Esplénico de la Zona Marginal (LEZM)	73
3.1.- Genes diferencialmente expresados entre LZMG y LEZM por microarrays de ADNc	73
3.2.-MiRNAs diferencialmente expresados entre LZMG y LEZM por microarrays	73
4.-Validación de los resultados de microarrays por PCR cuantitativa a tiempo real	74
4.1.-Genes diferencialmente expresados entre LZMG, GLR y LF	74
4.2.-MiRNAs diferencialmente expresados entre LZMG, GLR y LF	75
4.3.-Comparación entre los perfiles de expresión génica y de miRNAs en LZMG, GLR y LF: análisis de la varianza	76
5.- Validación de los resultados de microarrays por Inmunohistoquímica (IHQ)	76
6.- Homología entre LZMG y células B de memoria (CBM)	78
DISCUSIÓN	83
Caracterización molecular del linfoma de la zona marginal ganglionar (LZMG)	83
Diagnóstico diferencial frente a LF	87
Diagnóstico diferencial frente a LEZM	89
CONCLUSIONES	95
REFERENCIAS	99
ABREVIATURAS	115
ANEXOS	117
1.- Artículo I: (<i>Arribas et al. Blood 2012</i>)	119
2.- Artículo II: (<i>Arribas et al. Modern Pathology 2013</i>)	135
3.- Relación de artículos publicados	151

ABSTRACT

Introduction

The term marginal zone lymphoma (MZL) encompasses 3 rather unrelated lymphoma subtypes: the extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MZL-MALT), the nodal marginal zone lymphoma (NMZL), and splenic B-cell marginal zone lymphoma (SMZL). In the World Health Organization Classification of Tumors, all 3 types of MZL are considered distinct clinicopathologic entities (Swerdlow et al. 2008). NMZL is an uncommon form of small B-cell neoplasm originating in the lymph node, whose morphology resembles lymph nodes involved in MZL of the extranodal or splenic types, but without evidence of extranodal or splenic disease. NMZL molecular pathogenesis is still essentially unknown and whose differentiation from other small B-cell lymphomas is hampered by the lack of specific markers (Piris et al. 2011).

Research content

We have characterized the protein-coding genes and miRNA signature for NMZL and selected B-cell populations. The expression of selected protein-coding genes and miRNAs was validated in a large independent FFPE series by quantitative RT-PCR. Putative targets for the miRNAs were also identified. In the present work, we have analyzed gene expression, miRNA profile, and copy number data from 15 NMZL cases. For comparison, 16 follicular lymphomas (FLs), 5 lymph nodes infiltrated by MALT lymphoma, 4 lymph nodes infiltrated by splenic marginal zone lymphoma (LN-SMZL) and 31 SMZL in the spleen were included. The control cases were 8 reactive lymph nodes (RLN), 7 spleens with reactive lymphoid hyperplasia (RLH) and B-cell subtypes. The results were validated by quantitative RT-PCR in an independent paraffin-embedded series including 61 NMZL, 77 SMZL, 57 FL, 5 MZL-MALT, 4 LN-SMZL, 7 RLN and 6 RLH.

NMZL signature showed an enriched expression of gene sets identifying interleukins, integrins, CD40, PI3K, NF- κ B, and TGF β , and included genes expressed by normal marginal zone cells and memory B cells. The most highly overexpressed genes were *SYK*, *TACI*, *CD74*, *CD82*, *CDC42EP5*, *TFEB*, *LYN*, *UCP2*, *ACP5* and *HLA-DMA*. Genes linked to G2/M and germinal center were down-regulated. The expression profiles of lymph nodes infiltrated by NMZL, MZL-MALT, and SMZL were compared statistically revealing no differentially expressed genes. A *t* test showed 4 miRNAs to be significantly deregulated in NMZL compared with RLN: 3 of them were up-regulated (*miR-221*, *miR-555*, and *miR-29c*) and one was down-regulated (*miR-532-5p*). The prediction targets for *miR-221* and *miR-555* included the repressed genes *LMO2* and *CD10*, whereas *miR-532-5p* showed targets in the up-regulated *SYK*, *LYN* and *RELA* genes.

Comparison of the gene expression profiles of NMZL and FL showed enriched expression of *CHIT1*, *TACI*, *TRAF4*, *TGFB1*, *CD82*, *PTPN1* and *CD44* in NMZL, and *BCL6*, *LMO2*, *GCET1* and *CD10* in FL. GSEA analysis revealed enriched pathways related to memory B cells in NMZL compared with FL. We also found the IL10 pathway to be strongly represented in NMZL. Genes linked to the GC were up-regulated in FL. MiRNAs differentially expressed between NMZL and FL were also investigated, revealing 61 deregulated miRNAs: 24 were up-regulated and 37 were repressed in NMZL. Some of the up-regulated miRNAs were *miR-223* and *let-7f*, whose putative targets are *LMO2* and cell cycle-related genes, respectively. The functional relationship between *miR-223* and *LMO2* in B cells has already been demonstrated (Zhang et al. 2010). The *let-7* cluster, including *let-7f* miRNA, is involved in cell cycle regulation and cell division (Barh et al. 2010). FL showed strong expression of *miR-494*, *miR-765* and *miR-370* among others.

We also studied the miRNA expression patterns of SMZL relative to NMZL obtaining 44 miRNAs differentially expressed between these subtypes of marginal lymphoma: These included 19 miRNAs from the SMZL signature, some of which were the most important miRNAs, such as *miR-21*, *miR-155*, *miR-100*, *miR-27b*, *miR-376a* and *miR-377*. Similarly, among the miRNAs with increased expression in NMZL were several already known to be overexpressed in this lymphoma type, such as *miR-199a*.

Conclusions

This analysis shows that the NMZL gene expression profile reproduces the signature of normal marginal zone and memory B cells, identifies BCR signaling, interleukins, integrins and survival pathways (NF- κ B, TNF, TGFB) as the most significant pathways in NMZL pathogenesis, and allows new specific markers (*TACI*, *CHIT1*, *CD44*, *CD82*, *TGFB1*, *miR-223*, *let-7f* and *miR-221*) to be proposed as a means of distinguishing this lymphoma type from FL. Our study also identifies some possible therapeutic targets, such as *TACI* and *CD74*.

References

- Barh D, Malhotra R, Ravi B, Sindhurani P. *Microrna let-7: an emerging next-generation cancer therapeutic*. Curr Oncol. 2010;17(1):70-80.
- Piris MA, Arribas A, and Mollejo M. *Marginal zone lymphoma*. Semin Diagn Pathol. 2011;28(2): 135-145.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008.
- Zhang J, Jima DD, Jacobs C, et al. *Patterns of microRNA expression characterize stages of human B-cell differentiation*. Blood. 2009;113(19):4586-4594.



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.- El linfoma de la zona marginal en la clasificación de los linfomas

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica las neoplasias linfoides describiendo los criterios clínicos, morfológicos, inmunofenotípicos, genéticos y moleculares propias de cada una de ellas. En su edición más reciente (2008), reconoce tres entidades de linfoma B de bajo grado relacionadas con la zona marginal: el linfoma de la zona marginal extraganglionar de tipo MALT, tejido linfoide asociado a mucosa (LZM-MALT); el linfoma esplénico de la zona marginal (LEZM); y el linfoma de la zona marginal ganglionar (LZMG) (Swerdlow et al. 2008). Estos tres subtipos de linfoma marginal comparten características morfológicas, fenotípicas y patogénicas comunes y difieren en otros aspectos como las alteraciones moleculares, la presentación clínica y el tratamiento recomendado (Piris et al. 2011).

El linfoma de la zona marginal (LZM), en cualquiera de sus tres subtipos, queda incluido dentro del grupo de neoplasias de células B maduras de célula pequeña (Tabla 1).

Tabla 1. Neoplasias de células B maduras en la clasificación de la OMS de 2008.

Neoplasias de células B maduras	
Leucemia linfocítica crónica/Linfoma de linfocitos pequeños	Linfoma de células foliculares cutáneo primario
Leucemia prolinfocítica de células B	Linfoma de células del manto
→ Linfoma esplénico de la zona marginal	Linfoma difuso de células grandes no especificado de otro modo: – Linfoma de células B rico en células T/histiocitos – Asociado con inflamación crónica – Positivo a VEB, del anciano
Leucemia de células peludas	Granulomatosis linfomatoide
Leucemia/Linfoma esplénico no clasificable: – Linfoma de células B pequeñas, difuso, de la pulpa roja – Variante de leucemia de células peludas	Linfoma de células grandes mediastinal primario (tímico)
Linfoma linfoplasmacítico: – Macroglobulinemia de Waldenström	Linfoma B de células grandes intravascular (angiotrópico)
Enfermedad de cadenas pesadas: – Enfermedad de cadenas pesadas α – Enfermedad de cadenas pesadas γ – Enfermedad de cadenas pesadas μ	Linfoma primario cutáneo B de célula grande difuso tipo pierna
Neoplasia de células plasmáticas – Mieloma de células plasmáticas – Plasmocitoma solitario de hueso – Plasmocitoma extraóseo	Linfoma de células grandes ALK-1 positivo
→ Linfoma de la zona marginal extraganglionar, de tejido linfoide asociado a mucosa (MALT)	Linfoma plasmablastico
→ Linfoma de la zona marginal ganglionar: – Linfoma de la zona marginal ganglionar, tipo pediátrico	Linfoma primario de cavidades
Linfoma Folicular: – Linfoma folicular, tipo pediátrico	Linfoma de células B grandes en enfermedad de Castleman multicéntrica asociada a HHV8
	Linfoma de células B, no clasificable, con características intermedias entre linfoma difuso de células grandes y linfoma de Burkitt
	Linfoma de células B no clasificable, con características intermedias entre linfoma difuso de células grandes y linfoma de Hodgkin clásico

2.- La zona marginal normal

En el folículo linfoide secundario se diferencian morfológica e inmunofenotípicamente tres zonas: el centro germinal (CG), la zona del manto (MN) y la propia zona marginal (ZMn). La ZMn fue descrita por primera vez en el bazo y el conocimiento de la composición celular y la función deriva de estudios realizados en modelos animales (Guinamard et al. 2000, Kanswal et al. 2008). La zona marginal es un área concéntrica al manto folicular presente en órganos linfoides secundarios por lo general sometidos a estimulación antigénica (bazo, amígdalas, ganglios linfáticos, ganglios mesentéricos y placas de Peyer) (Figura 1). La población celular mayoritaria en la ZMn está compuesta de linfocitos B de tamaño medio y citoplasma claro acompañados de macrófagos, granulocitos y células dendríticas. Estas últimas, están especializadas en capturar antígenos circulantes y presentarlos a las células residentes de la ZMn estimulando así la diferenciación a linfocitos B de memoria. De acuerdo con esta condición de células de memoria, presentan hipermutación somática en la región variable del gen de la cadena pesada de las Ig (IgV_H).

Las células de la ZMn presentan expresión de marcadores de célula B como CD20, CD19 y CD79a; sin expresión de CD5, CD10 y CD23. La expresión de la IgM es alta, por lo general más alta que las IgA e IgG, con expresión variable de IgD. Además expresan CD27, CD21, CD35, fosfatasa alcalina y BCL2; y no expresan BCL6 ni ciclina D1. Recientemente se han descrito los genes *IRTA1* y *MNDA* como marcadores selectivos de la ZMn (Falini et al. 2003, Kanellis et al. 2009). Adicionalmente a estos marcadores, se ha descrito un grupo de genes con elevada expresión en la ZMn: *CARD11*, *CXCL12*, *CXCR6*, *TACI*, *MMP12*, *APRIL*, *LTB*, *IFNGR1*, *COL3A1*, *AKAP13* e *IL2R* (Shen et al. 2004).

La zona del manto (MN) está situada concéntrica al centro germinal y por dentro de la ZMn. En ella, los linfocitos permanecen latentes en estado pre-CG y expresan un fenotipo: IgM⁺, IgD⁺, CD5⁺ y CD20⁺. El centro germinal (CG) ocupa la parte central del folículo linfoide y es donde tiene lugar la transformación y maduración de los linfocitos B a linfocitos de memoria y a células plasmáticas tras la estimulación antigénica. La subpoblación celular predominante son centrocitos y centroblastos con inmunofenotipo IgM⁺, IgD⁻, CD20⁺, CD10⁺ y BCL6⁺ (Figura 1).

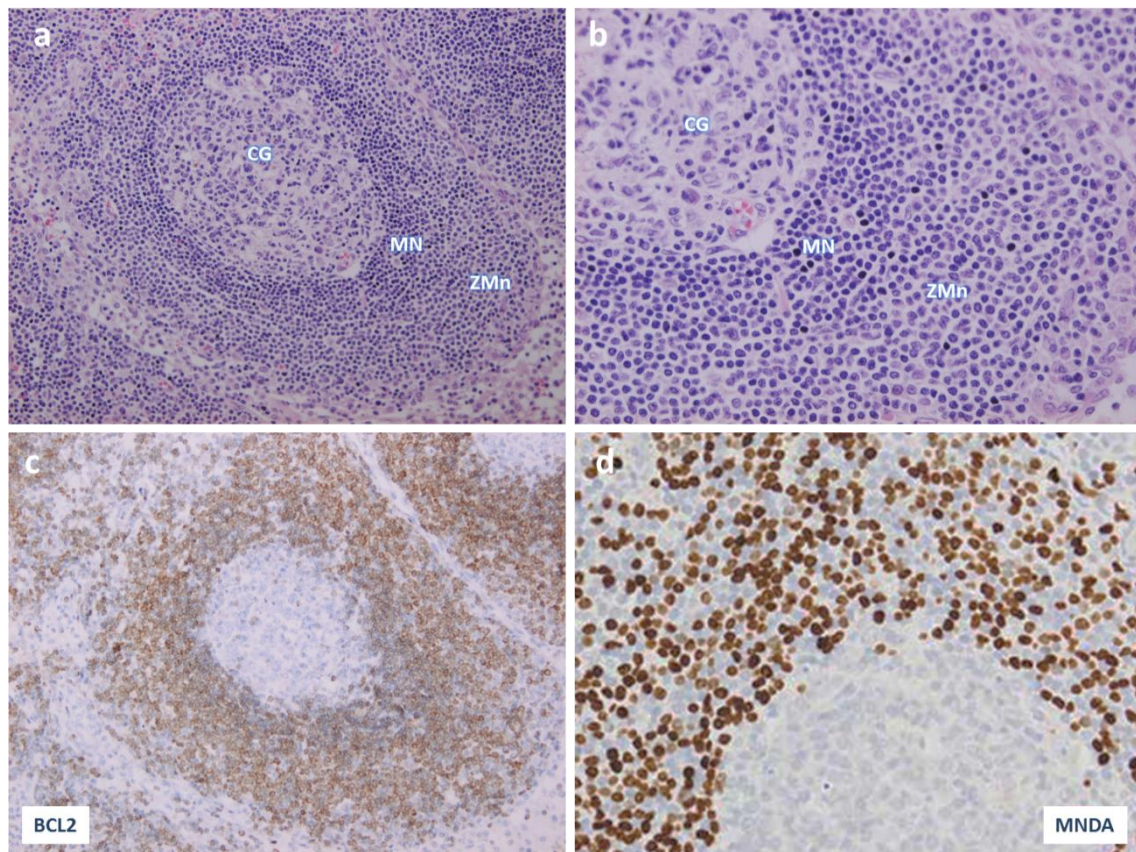


Figura 1. Folículo linfoide reactivo. a y b) Hematoxilina y eosina: Morfología e histología del centro germinal (CG), zona del manto (MN) y zona marginal (ZMn). c) Bcl2: Centro germinal bcl2- y manto y zona marginal bcl2+. d) MNDA: Zona marginal MNDA+, centro germinal MNDA-.

La función de la ZMn ha sido bien estudiada en ratones, donde se ha demostrado que las células de la ZMn están implicados en la respuesta inmune TI-2 (timo independiente). En virtud de la localización histológica de la zona marginal, más próxima a la linfa aferente, la respuesta inmune basada en la misma permite una reacción más rápida frente a antígenos bacterianos. Además, el grado de exposición al antígeno determina la intensidad en la actividad de la zona marginal lo que explica la gran variabilidad descrita en la presencia de mutaciones somáticas en el gen IgV_H (Guinamard et al. 2000).

3.- Linfoma de la zona marginal ganglionar (LZMG)

El LZM incluye una constelación de diferentes enfermedades con algunas características morfológicas, inmunofenotípicas y patogénicas comunes, pero que en la

mayoría de los casos muestra diferente presentación clínica, distintas alteraciones moleculares y diversas recomendaciones terapéuticas (Piris et al. 2011).

El linfoma de la zona marginal ganglionar (LZMG) es un linfoma B que afecta a los ganglios linfáticos con una morfología similar a la presentada por los ganglios infiltrados por LEZM o LZM-MALT pero sin evidencia de afectación en localización MALT o esplénica (Traverse-Glehen et al. 2012). En 1986, *Sheibani* diagnostica por primera vez 3 casos de linfoma B de bajo grado acuñando el término linfoma B monocitoide pues la morfología y el inmunofenotipo de las células tumorales se asemejaban a los de la célula B monocitoide (Sheibani et al. 1986). Un año después, *Cousar* propuso el término linfoma parafolicular debido a la morfología y al patrón arquitectural del tumor (Cousar et al. 1987). La relación del linfoma monocitoide con la ZMn fue sugerida por *Piris* en 1988 (Piris et al. 1988). *Harris* y colaboradores proponen la entidad linfoma de la zona marginal ganglionar como un subtipo dentro del linfoma de la zona marginal extranodal de tipo MALT (Harris et al. 1994) para posteriormente definir el LZMG como una entidad independiente de los otros dos subtipos de LZM en 1999 (Harris et al. 1999). Actualmente, según la última clasificación de la OMS, se considera una entidad clínico-patológica distinta de los demás subtipos de linfoma B de bajo grado (Swerdlow et al. 2008).

3.1.- Manifestaciones clínicas: la frecuencia del LZMG es muy baja, menos del 2% de las neoplasias linfoides (Swerdlow et al. 2008). La edad media de aparición varía dependiendo de las series publicadas, 57 años de la serie francesa de *Traverse-Glehen* (Traverse-Glehen et al. 2006), 62 años del estudio de *Camacho* (Camacho et al. 2003) y 63 años de la serie italiana publicada por *Arcaini* (Arcaini et al. 2007). Las localizaciones más frecuentes de las adenopatías en el momento del diagnóstico son periférica (cuello, inginal y axilar) y abdominal (ganglios paraaórticos y mesentéricos) (Nathwani et al. 1999). La afectación de la médula ósea está presente en alrededor del 40%, variando desde un 28% (Nathwani et al. 1999) hasta un 62% (Traverse-Glehen et al. 2006); mientras que la infiltración de sangre periférica y las citopenias son raras (Arcaini et al. 2009). La progresión del LZMG a linfoma B de célula grande es un evento inusual que si sucede, comúnmente ocurre en el ganglio linfático, sin infiltración extraganglionar (Piris et al. 2011).

En pacientes jóvenes, la OMS distingue el subtipo de linfoma de la zona marginal "pediátrico", que presenta características clínicas distintas y por lo general se diagnostica en estadios tempranos con un pronóstico excelente (Arcaini et al. 2009).

3.2.- Morfología: la arquitectura tumoral en el ganglio linfoide suele ser muy característica, con un patrón de crecimiento de las células neoplásicas en la zona perifolicular, rodeando los centros germinales y con frecuentes imágenes de colonización de los folículos linfoides. Este patrón nodular es evidente con tinciones para dendríticas, que muestran los centros residuales, incluso cuando el patrón es difuso (de Leval et al. 2001, Salama et al. 2009). La citología tumoral es polimorfa y aunque la población predominante son los linfocitos B pequeños con citoplasma claro (células de la zona marginal), pueden encontrarse también células tipo centrocito, células B monocitoides, células grandes aisladas y células con diferenciación plasmacítica ocasionales.

3.3.- Inmunofenotipo: El fenotipo en la mayoría de los casos es semejante al LZM-MALT: IgD⁻, CD20⁺, CD5⁻, CD10⁻, BCL2⁺, BCL6⁻, CD23⁻, CD43^{+/-}, IgM⁺, ciclina D1⁻, IRTA1⁺, MNDA⁺ (Arcaini et al. 2009, Piris et al. 2011) ; aunque existe un grupo similar al LEZM, donde el fenotipo es IgD⁺, (Campo et al. 1999). Ocasionalmente, algunos casos muestran el fenotipo característico de las células B monocitoides: BCL2⁻, p21⁺, ciclina E⁺, IRTA1⁺; lo que ha sido sugerido como un estadio concreto de activación en el curso de la enfermedad (Camacho et al. 2001).

3.4.- Alteraciones moleculares: aunque en los otros subtipos de LZM han sido descritas alteraciones moleculares características, como la pérdida de 7q22-31 en LEZM o la t(11;18) en LZM-MALT, en el LZMG no se conoce ninguna alteración molecular específica de este linfoma. Las alteraciones moleculares más frecuentemente encontradas, si bien no son exclusivas del LZMG, son la trisomía del cromosoma 3 (50-70%) y la delección en 6q23 que supone una disminución en la expresión de *TNFAIP3* (*A20*), regulador negativo de NF-κB (Honma et al. 2009, Kato et al. 2009, Novak et al. 2009). *TNFAIP3* puede verse también inactivado por mutación somática y/o microdelección en secuencias exónicas del gen en un 33% de los pacientes (Novak et al. 2009). La condición de regulador negativo de NF-κB por parte de *TNFAIP3*, repercute en la activación de NF-κB, tanto por delección de 6q23 como por mutación en el gen (Honma et al. 2009, Kato et al. 2009, Novak et al. 2009).

Recientemente, un estudio citogenético en LZMG ha identificado una nueva alteración cromosómica, la t(11;14)(q23;q32) en 1 de 7 casos, con participación de los

genes *IgH* y *DDX6*, proponiendo una posible contribución de *DDX6* en la patogenia del LZMG por desregulación de *BCL6* de forma independiente a NF- κ B (Stary et al. 2013).

Adicionalmente a las anteriores, pueden presentarse, con frecuencia variable, otras alteraciones citogenéticas como +7, +12, +18; reordenamientos afectando a diversas zonas del cromosoma 1 (1q21, 1p34, 1p36); ganancias en 1q, 6p, 8q, 12q y 18q; y deleciones en 19q13 (Ferreira et al. 2008, Salido et al. 2010, Rinaldi et al. 2011, Stary et al. 2013).

3.5.- Hipermutación somática: los reordenamientos en el gen de las Inmunoglobulinas son un evento característico de las células B, permitiendo una gran variabilidad de anticuerpos capaces de reconocer por tanto el mayor número posible de antígenos. Además de estos reordenamientos, propios de la maduración de la célula B en la médula ósea, en el CG del folículo linfoide tiene lugar la hipermutación somática en IgV_H , aportando un extra de variabilidad y afinidad de los anticuerpos. La naturaleza de las mutaciones somáticas en IgV_H permite distinguir distintas subpoblaciones celulares en el folículo linfoide secundario: células B “vírgenes” sin mutaciones en el gen IgV_H , células de CG con mutaciones en IgV_H y variabilidad intraclonal, y células B de memoria con mutaciones somáticas en IgV_H y selección antigénica (Conconi et al. 2001) (Figura 2). Por último, el estudio de estas mutaciones permite determinar el estado de maduración de las células tumorales y con ello estimar el origen de la población neoplásica (Camacho et al. 2003) (Figura 2).

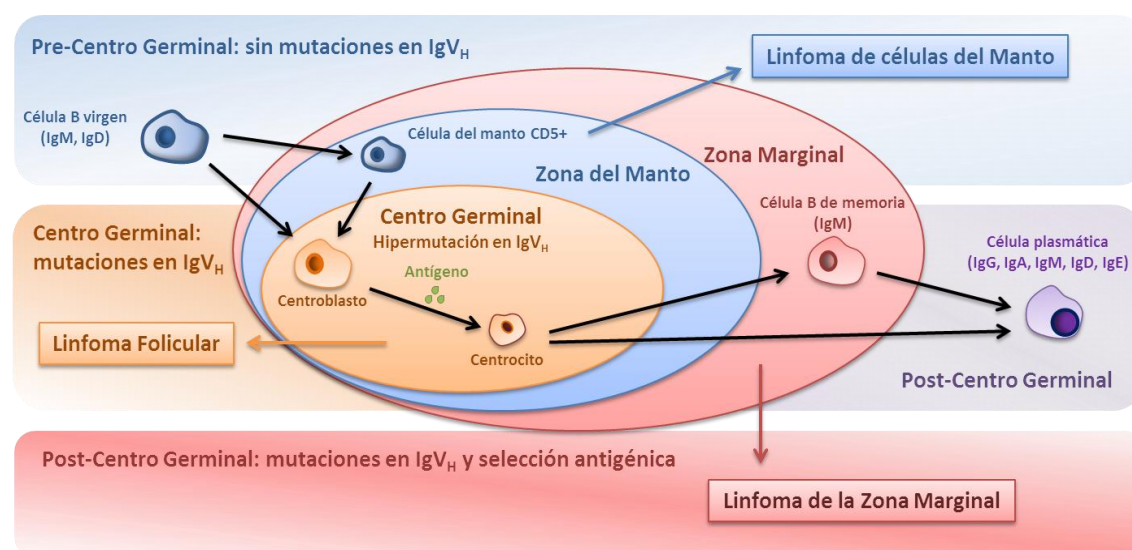


Figura 2. Diagrama representativo de la diferenciación de célula B en el folículo linfoide y su relación con los linfomas B de bajo grado.

La serie española de *Camacho y col.* demostró la presencia de hipermutaciones con predominio de la subfamilia VH₃ (80%) (Camacho et al. 2003) mientras que la serie francesa publicada por *Traverse-Glehen y col.* encontró una mayor frecuencia de VH₄₋₃₄ (50%) (Traverse-Glehen et al. 2005). Sin embargo, el reducido tamaño de las series publicadas no permite relacionar estos datos con parámetros clínicos (Rinaldi et al. 2011, Traverse-Glehen et al. 2012).

3.6.- Estimulación antigénica crónica: la importancia del microambiente en la patogénesis de los linfomas ha sido demostrada gracias a las observaciones que vinculan enfermedades autoinmunes o patógenos virales y bacterianos específicos con determinados tipos de síndromes linfoproliferativos (Herreros et al. 2008). La estimulación inflamatoria crónica puede, en ocasiones, suponer una situación previa al tumor y por tanto contribuir en la aparición y el desarrollo de los linfomas (Mantovani et al. 2008, Vendrame and Martínez-Maza 2011).

Los linfomas no-Hodgkin han sido asociados con el Virus de la Hepatitis C (VHC) en su patogenia, y en concreto el LZMG ha sido descrito como la neoplasia más frecuentemente asociada con el VHC (Zuckerman et al. 1997, Arcaini et al. 2007). Dependiendo de la serie publicada, la frecuencia encontrada para el VHC es variable: 24% en la serie publicada por *Arcaini et al.* (Arcaini et al. 2007), un 20% en la serie de *Camacho et al.* (Camacho et al. 2003), un 5% en la serie de *Oh et al.* (Oh et al. 2006) mientras que en el estudio de *Traverse-Glehen et al.* (Traverse-Glehen et al. 2006) no se detectó ningún caso con VHC.

La presencia o ausencia del VHC puede determinar el tipo de subfamilia utilizada en el reordenamiento de los genes de inmunoglobulina. De esta forma, en la serie publicada por *Marasca y col.*, en los casos VHC⁺ predominó la subfamilia VH₁₋₆₉ mientras que en los negativos lo hizo la familia VH₄₋₃₄ (Marasca et al. 2001).

3.7.- Diagnóstico diferencial: el diagnóstico diferencial del LZMG frente a otros linfomas de bajo grado, especialmente frente al linfoma folicular, o frente a situaciones no tumorales, como la hiperplasia reactiva o la linfocitosis monoclonal, requiere en muchas ocasiones de la combinación de hallazgos clínicos, morfológicos, inmunofenotípicos y genéticos. Esta dificultad se debe a la ausencia de criterios claros y reproducibles en el diagnóstico como consecuencia de la falta de marcadores específicos de LZMG (Piris et al. 2011, Traverse-Glehen et al. 2012).

1. El **linfoma folicular (LF)** con patrón de diferenciación marginal puede ser histológicamente indistinguible de un LZMG con colonización folicular (Traverse-Glehen et al. 2012). En estos casos, pueden utilizarse tinciones con marcadores de CG como BCL6, CD10 o GCET1, que serán positivos para el LF y negativos en el LZMG. Sin embargo, hay casos en que el LZMG presenta centros germinales residuales con colonización parcial por células de la zona marginal, que pueden dar tinciones CD10⁺/BCL6⁺, por lo que la t(14;18)(q32;q21) puede ayudar a discriminar en estas ocasiones (Arcaini et al. 2009). Recientemente, nuestro propio grupo identificó al gen *MNDA* como nuevo marcador con valor diagnóstico en LZMG frente a LF, aunque ocasionalmente casos de LF pueden mostrar expresión de MNDA (Kanellis et al. 2009).
2. El LZM extraganglionar, tanto el **LEZM** como el **LZM-MALT**, son histológica y morfológicamente indiferenciables del LZMG, por lo que la localización primaria del tumor es esencial en el diagnóstico. No obstante, cuando la enfermedad está diseminada a ganglios y bazo, el diagnóstico puede ser difícil, más si tenemos en cuenta que el LZMG puede presentar fenotipos similares tanto al LEZM (IgD⁺) como al LZM-MALT (IgD⁻).
 - frente a LZM-MALT: marcadores moleculares como la t(11;18)(q21;q21), con frecuencia variable según la localización del tumor (Du et al. 1997), o la expresión de MALT1, BCL10 y FOXP1 (Swerdlow et al. 2008) pueden servir de ayuda en el diagnóstico de estos tumores.
 - frente a LEZM habrá que tener en cuenta alteraciones citogenéticas como la del(7q) que se encuentra en el 40% de los pacientes con linfoma esplénico (Ferreira et al. 2008, Salido et al. 2010).
3. Situaciones **no tumorales**, como la hiperplasia folicular reactiva en el ganglio (GLR) o la linfocitosis B monoclonal (LBM), pueden también reproducir el patrón de infiltración por células de la zona marginal y presentar por tanto dificultad en el diagnóstico diferencial (Nieto et al. 2009, Lanasa et al. 2010, Shanafelt et al. 2010).
4. El **linfoma de células del manto (LCM)** puede presentarse también con un patrón similar al LZM. En estos casos, la tinción con ciclina D1 o el estudio de la t(11;14), típicas del LCM ayudan al diagnóstico (Swerdlow et al. 2008).
5. La **leucemia linfática crónica (LLC)** suele presentarse con patrón difuso, pero en ocasiones infiltración focal puede tener un patrón interfolicular. El diagnóstico será a favor de LLC si:

- inmunofenotipo IgD⁺, CD5⁺, CD23⁺, CD43⁺
- citometría para CD22/CD25
- alteraciones citogenéticas detectables por FISH:
 - 13q14.3 (50%)
 - 11q22-23 (20%)
 - trisomía 12 (20%)

(Piris et al. 1998, Ocio et al. 2005, Swerdlow et al. 2008)

3.8.- Factores con valor pronóstico: los trabajos publicados hasta ahora en LZMG se limitan a series de pequeño tamaño por lo que se carece de marcadores biológicos pronósticos (Piris et al. 2011). Por ello se hace necesario mejorar nuestro conocimiento sobre los mecanismos moleculares implicados en la patogenia de este tumor, para de acuerdo a esto poder identificar nuevos marcadores con valor diagnóstico y pronóstico. No obstante, han sido publicados algunos índices pronósticos clínicos en LZMG:

1. El **IPI**, *International Prognostic Index*, fue originalmente creado para linfomas de alto grado, y aunque se ha descrito su utilidad en linfomas de bajo grado, en las series publicadas en LZMG solo es capaz de pronosticar un reducido grupo de pacientes con alto riesgo (Traverse-Glehen et al. 2012).
2. El **FLIPI**, *Follicular Lymphoma International Prognostic Index*, ha sido también utilizado en LZMG en distintas series, llegando incluso a discriminar significativamente grupos con diferente supervivencia global (Oh et al. 2006, Arcaini et al. 2007).
3. Otros factores clínicos y biológicos, han sido relacionados con pronóstico y con supervivencia. En la tabla 2 se muestra un resumen de estos factores.

Tabla 2. Factores clínicos y biológicos relacionados con pronóstico y supervivencia en las series publicadas en LZMG. LDH: lactato deshidrogenasa. ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*. VHC: virus de la hepatitis C. Modificada de la revisión de *Arcaini y col.* (Arcaini et al. 2009).

Serie	Revista	Año	Factores Pronósticos	Supervivencia Global
<i>Camacho et al.</i>	<i>Am J Surg Pathol</i>	2003	Survivina – Caspasa 3 –	Ciclina E +
<i>Petit et al.</i>	<i>Haematologica</i>	2005	---	Ki67 + IRF4 +
<i>Oh et al.</i>	<i>Ann Hematol</i>	2006	Edad > 60 LDH elevada Hemoglobina > 12 g/l Infiltración de médula ósea No antraciclina ECOG ≥ 2 Estadio III / IV	Síntomas B ECOG ≥ 2 Hemoglobina > 12 g/l Infiltración de médula ósea Estadio III / IV
<i>Arcaini et al.</i>	<i>Br J Haematol</i>	2007	Síntomas B Hemoglobina > 12 g/l	Edad > 60 LDH elevada Infiltración de médula ósea VHC +
<i>Kojima et al.</i>	<i>Cancer Sci</i>	2007	---	Edad > 60

3.9.- Tratamiento: no existe un tratamiento estándar, depende de las circunstancias clínicas específicas de la enfermedad en cada paciente (Piris et al. 2011). Así, en estadíos tempranos, los pacientes suelen tratarse con cirugía y radioterapia, mientras que en etapas más avanzadas del linfoma, el tratamiento consiste en la combinación de rituximab con quimioterapia (Arcaini et al. 2009). Adicionalmente a este tratamiento más estandarizado, otros fármacos como bortezomib (inhibidor del proteosoma) o veltuzumab (anti-CD20 humanizado), han sido utilizados en el tratamiento de linfomas no-Hodgkin, incluyendo LZMG, con algunos casos de remisión parcial en LZMG (O'Connor et al. 2005, Morschhauser et al. 2009).

En aquellos pacientes VHC⁺ que no requieran tratamiento urgente del linfoma, pueden administrarse fármacos antivirales como ribavirina (Vallisa et al. 2005).

4.- Microarrays en el estudio de perfiles de expresión

Una microarray de ADNc es una técnica molecular que consiste en la imprimación de gran cantidad de secuencias de ADN, llamadas *spots* o sondas, en un soporte físico, por lo general de cristal (Figura 3). Cada una de esta sondas se corresponde con la secuencia complementaria a un fragmento de ADN o ARN específico, lo que permite analizar la expresión de miles de genes o miRNAs en un único experimento. Actualmente existen múltiples tipos de microarrays (también conocidos como *chips*) de muy diversas casas comerciales, dependiendo del objetivo del estudio:

- estudios de expresión génica con microarrays de ADN u oligonucleótidos
- perfiles de expresión de miRNAs por microarrays de miRNA
- análisis de número de copias (ANC) con microarrays de CGH
- patrones de metilación del ADN: microarrays de metilación
- polimorfismos por arrays de SNPs

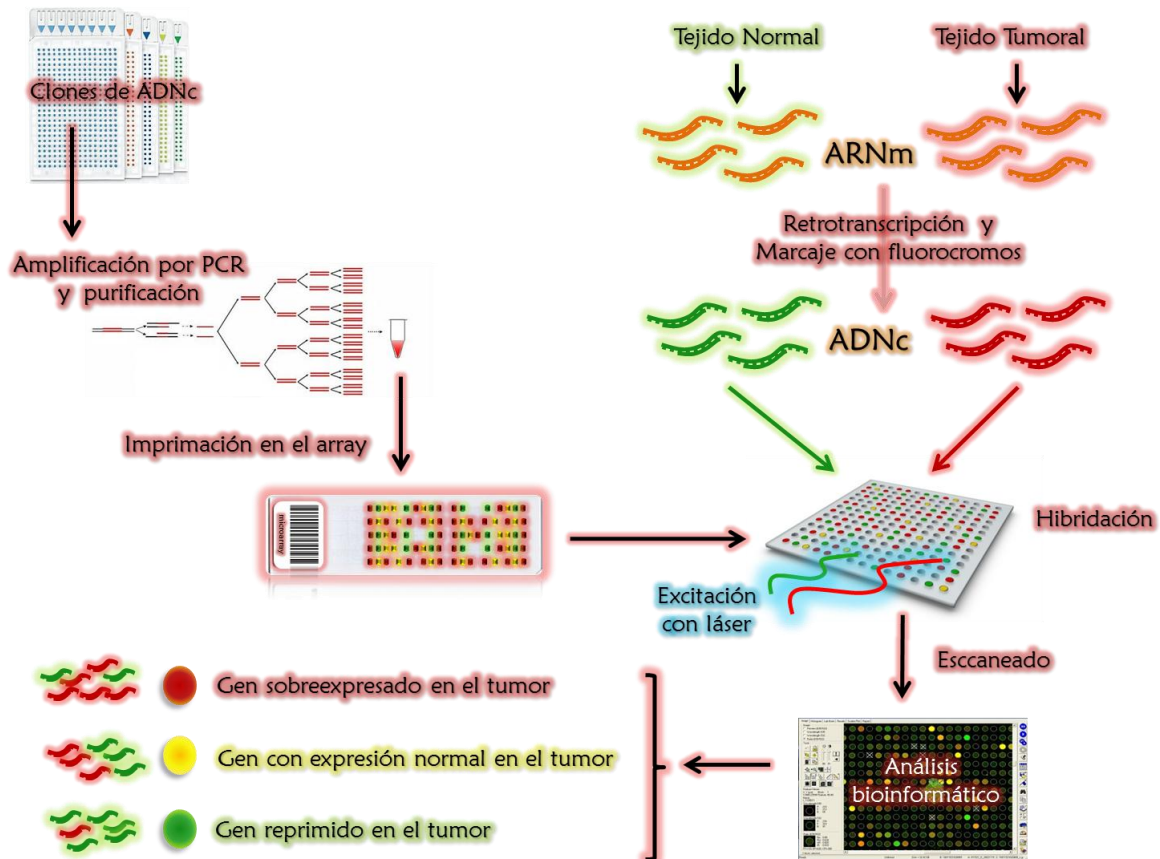


Figura 3. Microarrays de ADNc. Diagrama representativo de la fabricación y el protocolo de hibridación y análisis de un microarray de expresión génica. Modificado a partir de *Duggan y col.* (Duggan, Bittner et al. 1999).

El primer trabajo de expresión génica en arrays data de fue publicado en 1995 por *Schena y col.* en la revista *Science* (Schena et al. 1995). Desde esta primera publicación, las microarrays han sido utilizadas masivamente en la investigación biomédica y muy especialmente para estudiar los mecanismos moleculares implicados en el cáncer, donde los microarrays permiten identificar genes y miRNAs con expresión diferencial, en concreto genes supresores de tumores y oncogenes. Esta identificación de genes y miRNAs desregulados aporta una visión global del perfil transcripcional de la enfermedad, que tras su validación funcional, puede suponer mejoras significativas en el conocimiento de la patogenia y el desarrollo del cáncer (Kaminski and Friedman 2002).

Una de las herramientas más utilizadas en el análisis de datos en microarrays es el *clustering*, gracias al cual podemos identificar genes involucrados en funciones comunes como la regulación de una misma ruta metabólica (Eisen et al. 1998). La aplicación de este análisis estadístico ha permitido facilitar el diagnóstico del cáncer discriminando entre situaciones tumorales y neoplásicas y mejorar las clasificaciones de algunos tumores (Quackenbush 2006). Sin embargo, como consecuencia de estudiar miles de genes en un solo experimento, habrá que analizar una matriz con elevado número de genes y reducido número de casos, lo que condiciona la reproducibilidad del ensayo (Yauk and Berndt 2007). Por tanto, se hace necesaria la validación de los resultados utilizando una técnica diferente aplicada a una serie independiente de muestras. Las técnicas más frecuentemente aplicadas a esta validación son la PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-CPR) y las tinciones inmunohistoquímicas (IHQ).

4.1.- Perfil de expresión génica en linfomas: la OMS en su clasificación de 2001 (Harris et al. 1999) incorporó por primera vez hallazgos moleculares en los criterios de clasificación de las neoplasias linfoides, manteniéndose después en la clasificación más reciente de 2008 (Swerdlow et al. 2008). La inclusión de estos nuevos criterios ha permitido completar la clasificación de linfomas en varios aspectos:

- distinguir nuevos subtipos tumorales (Golub et al. 1999)
- definir marcadores tumorales (Kobayashi et al. 2003)
- mejorar la caracterización tumoral (Alizadeh et al. 2000)

Por tanto, el estudio de los perfiles de expresión es de gran relevancia en las neoplasias linfoides, y de hecho, desde finales de los años 90 han aparecido numerosos trabajos donde se ha utilizado la técnica de microarrays en el estudio de los linfomas. En virtud de estos trabajos, se han identificado eventos genéticos con los que construir nuevas herramientas para facilitar el diagnóstico y el pronóstico (Tiwari 2011), y que permitan a su vez generar nuevas terapias con las que combatir la enfermedad (Lossos 2008).

La implicación del factor de transcripción NF- κ B en neoplasias linfoides es un evento frecuente en linfomas no Hodgkin, en los que se ha demostrado su activación mediante modelos experimentales y estudios de expresión génica (Karin et al. 2002). Genes implicados en rutas metabólicas y mecanismos antiapoptóticos, como *AKT*, *BCL2* o *BIRC5*, son activados por este conjunto de factores de transcripción, contribuyendo de esta manera en la patogenia de los desórdenes linfoproliferativos (Tracey et al. 2005).

Prácticamente todos los linfomas B de célula pequeña, han sido también estudiados por microarrays, identificando firmas moleculares y diversos factores implicados en la patogenia y el pronóstico de estos desórdenes:

1. **LLC**: se han descrito varios factores moleculares implicados en el pronóstico de esta leucemia, como alteraciones citogenéticas en 17p y 11q, la expresión de *CD38* y *ZAP-70* o el estado mutacional de IgV_H (Oscier et al. 2002, Wiestner et al. 2003, Schroers et al. 2005). A pesar de la existencia de estos factores, aún no se ha identificado un único factor pronóstico capaz de asignar una tratamiento eficiente a la enfermedad, por lo que el análisis del patrón molecular de estos tumores puede ayudar a clasificar los pacientes en grupos según su respuesta a la terapia. La expresión de genes relacionados con la activación del factor de transcripción NF-κB (Rodríguez et al. 2004) y la señalización de BCR (Davids and Brown 2012) han sido asociados con supervivencia en LLC.
2. **LF**: aunque la firma molecular del LF ya ha sido descrita (Husson et al. 2002), no se conocen marcadores biológicos robustos que permitan predecir el curso clínico de los pacientes. El factor biológico característico de este linfoma es la t(14;18), causante de la sobreexpresión de *BCL2* y comúnmente asociado a mal pronóstico (Christie et al. 2008). Estudios de expresión génica han identificado un grupo de genes capaz de clasificar a los pacientes en función del pronóstico, constituyendo una herramienta alternativa a los criterios clínicos e histológicos para la elección del tratamiento (Glas et al. 2005).
3. **LCM**: los estudios moleculares en este linfoma demuestran que los distintos subtipos descritos en la enfermedad hasta la fecha conforman una única entidad desde el punto de vista molecular con un alto grado de homogeneidad en su perfil de expresión, donde destaca la desregulación de genes implicados en señales de supervivencia. Sin embargo, pese a esta gran homogeneidad en el patrón de expresión génica, existe una variante indolente del LCM caracterizado por hipermutación en IgV_H, cariotipo no complejo y perfil de expresión propio con baja expresión de genes como *SOX11* y *HDGFRP3* entre otros (Fernández et al. 2010). Adicionalmente, se caracteriza también un subgrupo poco frecuente de MCL sin la t(11;14), inherente a este linfoma, y por tanto negativo para ciclina D1 (Martínez et al. 2003, Rosenwald et al. 2003).
4. **LZM**: la serie más amplia descrita hasta el momento para el estudio del perfil de expresión génica en **LEZM** fue publicado por nuestro grupo en 2005 (Ruiz-Ballesteros et al. 2005) demostrando la sobreexpresión de genes implicados en la

activación de BCR, TNF y NF- κ B y oncogenes como *RHOH* y *TCL1A*. Previamente a este estudio se publicaron otros dos trabajos donde se describe por un lado la sobreexpresión de *NOTCH2* (diferenciación de células de la zona marginal) (Troen et al. 2004) y por otro la sobreexpresión del gen antiapoptótico *AKT1* (Thieblemont et al. 2004).

En el **LZM-MALT** también se ha descrito, en dos trabajos independientes, el patrón de expresión génica por *microarrays*. El estudio de *Huynh y col.* describe una firma molecular del LZM-MALT gástrico que permite distinguirlo de la gastritis causada por *H. pylori* (Huynh et al. 2008) mientras que el ensayo de *Chng y col.*, llevado a cabo en muestras de pulmón, identifica grupos de genes deregulados que caracterizan a su vez a grupos de pacientes con características patológicas distintas (Chng et al. 2009).

Por último, en el **LZMG** no se ha identificado hasta la fecha el perfil de expresión génica.

5.- MicroRNAs

Los microRNAs (miRNAs) fueron descritos por primera vez en *C. elegans* por *Lee y col.* en 1993 (Lee et al. 1993), aunque no ha sido hasta la última década cuando se ha descubierto su gran potencial como moléculas reguladoras de la expresión génica. Según la base de datos *miRBase*, del Instituto Sanger (<http://www.mirbase.org/>), hasta el momento se han descrito en humanos 1527 precursores y 1921 miRNAs maduros tanto por homología de secuencias como por predicciones informáticas.

Los miRNAs son moléculas de ARN intrónico monocatenario de cadena sencilla y pequeño tamaño, de 18 a 24 nucleótidos. Estas moléculas son capaces de silenciar la expresión génica por interacción con secuencias complementarias al extremo 3' UTR del ARN mensajero (ARNm), causando su degradación, en caso de apareamiento de secuencia perfecto, o su represión en caso de apareamiento parcial (Figura 4).

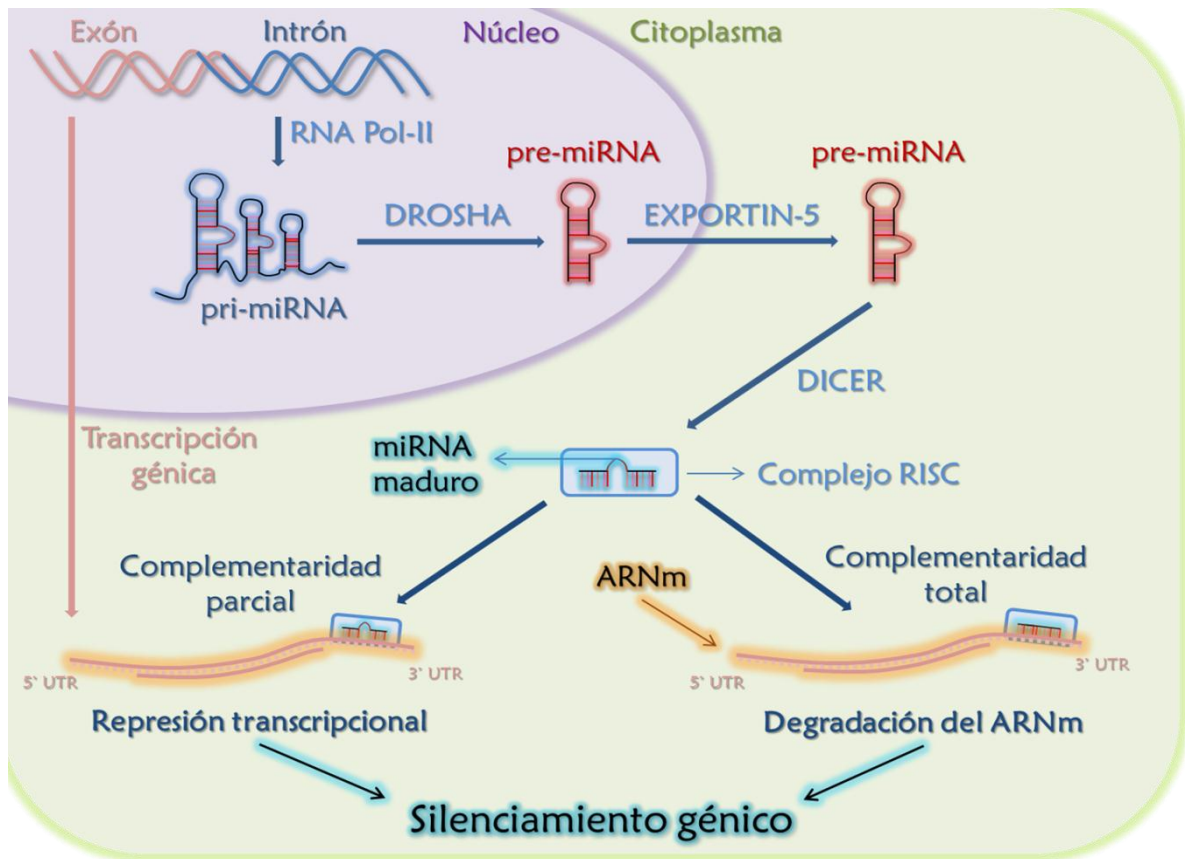


Figura 4. Mecanismo de silenciamiento génico por miRNAs.

5.1.- Procesamiento y mecanismo de silenciamiento génico: la enzima polimerasa RNA-pol II transcribe la secuencia de ADN formando transcritos endógenos de unos 200 pares de bases (pb) llamados pri-miRNAs (Lee et al. 2002, Cai et al. 2004). Estos pri-miRNAs son ahora reducidos por la enzima DROSHA generando estructuras en horquilla de unos 70 pb conocidos como pre-miRNAs, los cuales son transportados fuera del núcleo por la proteína transportadora EXPORTIN-5 (Lund et al. 2004). En el citoplasma, los pre-miRNA son madurados a estructuras bicatenarias de unos 20 pb por la enzima ribonucleasa DICER, tras lo cual, el complejo RISC, selecciona una única hebra de ARN funcional que formará el miRNA maduro (Lee et al. 2003). El complejo RISC-miRNA se une por fin al extremo 3' UTR del ARNm del gen diana, impidiendo su traducción y ocasionando por tanto el silenciamiento génico (Figura 3).

Del mismo modo que los factores de transcripción, varios miRNAs pueden regular a un mismo gen, a la vez que un único miRNA puede afectar a la expresión de más de un gen (Doench and Sharp 2004). La regulación de la transcripción en los miRNAs depende de las mismas rutas de señalización que el gen diana (Kim and Kim 2007).

5.2.- MiRNAs y célula B: se ha demostrado recientemente que los miRNAs juegan un papel crucial en el desarrollo del linfocito B, identificando miRNAs implicados en la homeostasis hematopoyética y en la diferenciación en los distintos estadios de célula B (Tan et al. 2009, Jima et al. 2010, Vasilatou et al. 2010).

MiR-223 podría estar implicado en la transición de célula B “virgen” a CG, y de ésta a célula B de memoria a través de la regulación del gen *LMO2*; mientras que *miR-9* y *miR-30* podrían regular al gen *PRDM1* el cual está implicado en la diferenciación de célula de CG a célula plasmática (Zhang et al. 2009). Además de *miR-223*, otros miRNAs han sido identificados regulando la diferenciación de célula B como *miR-150*, *miR-155*, *miR-181a* y *miR-146*. *MiR-150* controla al factor de transcripción *C-MYB* y se expresa en células B maduras (Xiao et al. 2007), *miR-155* controla la reacción de CG (Thai et al. 2007), *miR-181a* está implicado además en el desarrollo de célula T (Chen et al. 2004, Li et al. 2007) y por último *miR-146* bloquea la diferenciación de progenitor multipotente a progenitor linfoide (Georgantas et al. 2007) (Figura 5).

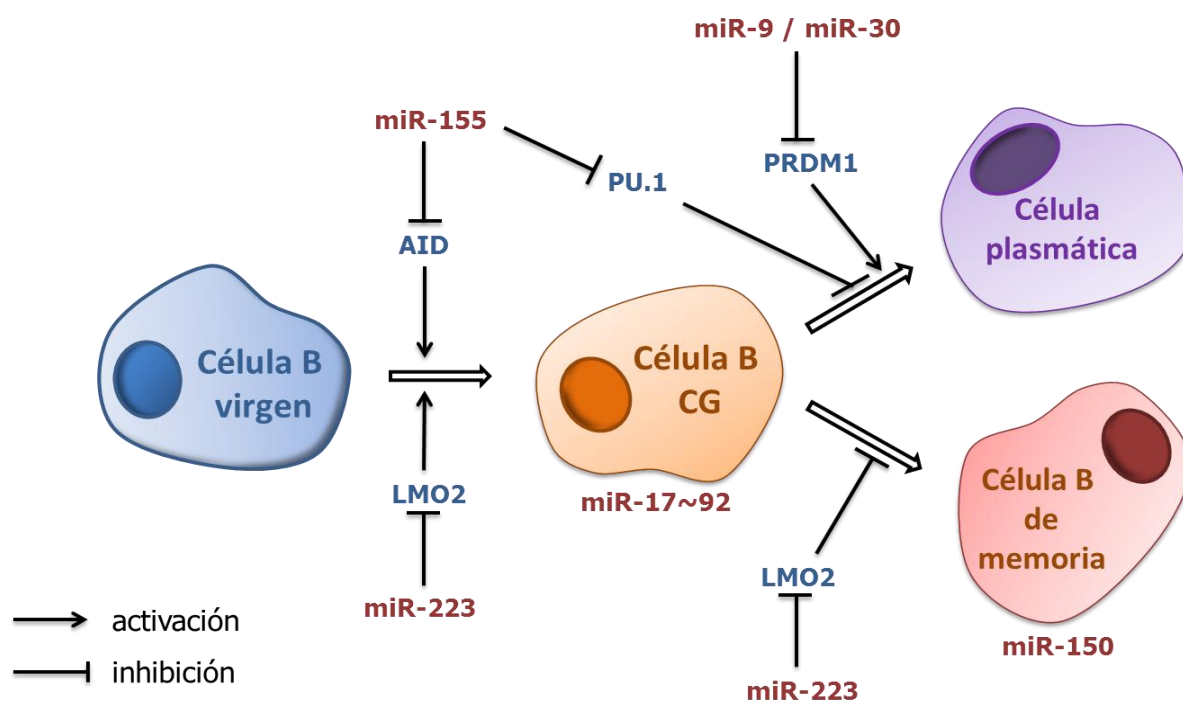


Figura 5. MiRNAs implicados en el desarrollo del linfocito B. En rojo aparecen los miRNAs reguladores y en azul sus genes diana. Modificada de Zhang y col (Zhang et al. 2009).

Diversas revisiones han descrito en los últimos años la implicación de los miRNAs en la regulación del sistema inmune, tanto en la función normal como en enfermedades autoinmunes (Pauley et al. 2009, Sonkoly and Pivarski 2009, O'Connell et al. 2010) (Tabla 3).

5.3.- MiRNAs y linfoma: la intervención de los miRNAs en neoplasias hematopoyéticas se ha estudiado exhaustivamente, demostrando que los miRNAs tienen un papel preponderante en los mecanismos moleculares implicados en cáncer (Vasilatou et al. 2010). Aunque la función más conocida de los miRNAs en cáncer es la de supresores de tumores, se han descrito miRNAs con actividad oncogénica (Lawrie 2008). En los últimos años se han descubierto, además, otros mecanismos de actuación de los miRNAs en cáncer. Así, algunos miRNAs virales están implicados en cáncer, como el *miR-K12-11* en linfomas B (Gottwein et al. 2007); y se ha visto que los miRNAs también intervienen en los mecanismos de regulación epigenética de genes supresores de tumores en leucemia mieloide (Garzon et al. 2009) (Figura 6).

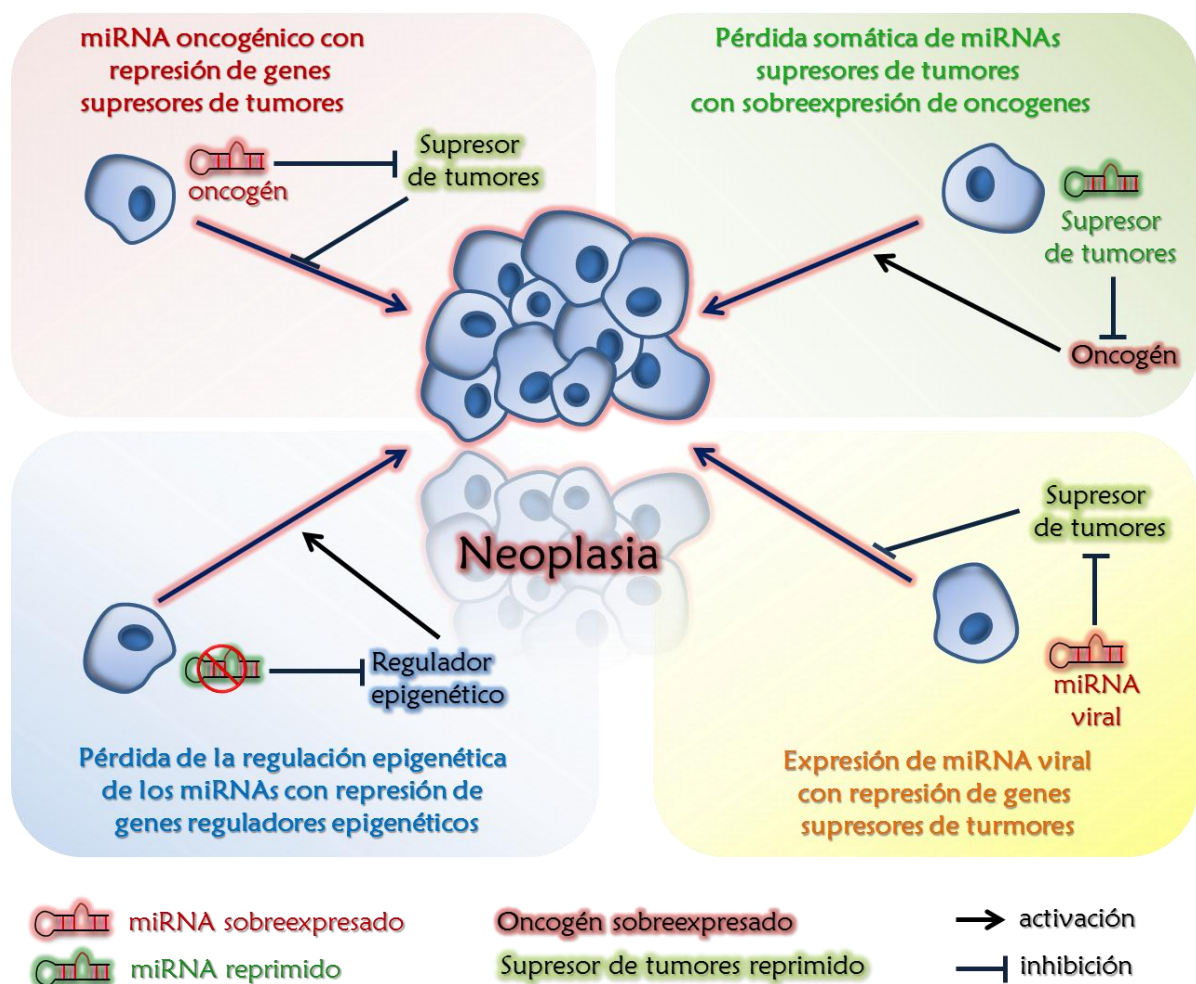


Figura 6. MiRNAs y cáncer: mecanismos de actuación. Modificada de la revisión de O'Connell y col. (O'Connell et al. 2010).

El cluster *miR-15a/miR-16-1* actúa como supresor de tumores regulando al oncogen *BCL2* en multitud de neoplasias linfoides, como LLC (Cimmino et al. 2005), linfoma de células del manto (LCM) (Chen et al. 2008), leucemia promielocítica aguda (LPA) (Garzon et al. 2007), mieloma múltiple (MM) (Roccaro et al. 2009) y linfoma B difuso de célula grande (LBDCG) (Eis et al. 2005). De forma similar, *miR-29b* y *miR-181b* actúan también como supresores de tumores en LLC regulando a *TCL1*, oncogen implicado en apoptosis via AKT (Pekarsky et al. 2006). *MiR-155* ha sido descrito con niveles elevados en diversos tumores linfoides, como linfoma de Hodgkin (LH), LBDCG y LLC (Eis et al. 2005, Kluiver et al. 2005). El cluster *miR-17-92* es uno de los miRNAs más frecuentemente descritos con actividad oncogénica en leucemias y linfomas: LBDCG, LCM (He et al. 2005), leucemia linfoblástica aguda (LLA) (Ventura et al. 2008) y leucemia mieloide crónica (LMC) (Venturini et al. 2007). Otro de los miRNAs con carácter oncogénico más estudiados en linfoma es el *miR-21*, regulador de *BCL2*, descrito en LBDCG (Lawrie 2007) (Tabla 3).

Tabla 3. Resumen de los miRNAs descritos en la regulación del sistema inmune normal, en enfermedades autoinmunes y en linfomas. AO: actividad oncogénica; ST: supresor de tumores. Modificada de las revisiones de *Pauley et al.*; *Sonkoly et al.* y *Vasilatou et al.* (Pauley, Cha et al. 2009, Sonkoly and Pivarcsi 2009, Vasilatou, Papageorgiou et al. 2010).

miRNA	Función inmune normal	Enfermedad autoinmune	Neoplasia linfóide	Función
<i>miR-146a</i>	Respuesta inmune innata Bloquea la diferenciación linfóide	Artritis reumatoide Psoriasis	---	---
<i>miR-125b</i>	Respuesta inmune innata	Psoriasis Eczema atópico	---	---
<i>miR-155</i>	Respuesta inmune innata y adaptativa Reacción de CG Cambio de clase Ig	Artritis reumatoide Inflamación vascular	Linfoma de Hodgkin Linfoma B de célula grande Leucemia linfática crónica	AO
<i>miR-181a</i>	Desarrollo de célula B Desarrollo de célula T Señalización de TCR	---	---	---
<i>miR-181b</i>	Cambio de clase Ig en células B activadas	---	Leucemia linfática crónica	ST
<i>miR-223</i>	Granulopoyesis	---	---	---
<i>miR-150</i>	Diferenciación de célula B	---	---	---
Cluster <i>miR-17-92</i>	---	Cirosis biliar primaria Lupus sistémico eritematoso Púrpura trombocitopénica idiopática	Linfoma B de célula grande Linfoma de células del manto Leucemia linfoblástica aguda Leucemia mieloide crónica	AO
<i>miR-29b</i>	---	---	Leucemia linfática crónica Linfoma esplénico de la zona marginal	ST
<i>miR-9</i>	Diferenciación de célula plasmática	---	Linfoma de Hodgkin	AO
<i>miR-21</i>	---	Psoriasis Eczema atópico	Linfoma B de célula grande	AO
Cluster <i>miR-15a / miR-16-1</i>	---	Artritis reumatoide	Leucemia linfática crónica Linfoma de células del manto Leucemia promielocítica aguda Mieloma múltiple Linfoma B de célula grande	ST

En cuanto al LZMG, hasta la fecha no se ha identificado el patrón de expresión de miRNAs. Sin embargo, el perfil de miRNAs en LEZM si que ha sido estudiado en tres trabajos previos, con resultados interesantes relacionados con 7q32, curso clínico y VHC. Nuestro grupo estudió en 2007 la expresión de los miRNAs en 7q32 describiendo la represión de *miR-29a* y *miR-29b* en una serie de 20 pacientes con LEZM al compararlos frente a otros linfomas B de bajo grado en el bazo (Ruiz-Ballesteros et al. 2007). En 2011 el grupo francés de *Bouteloup et al.* asoció la sobreexpresión de *miR-21* con curso clínico agresivo en LEZM (Bouteloup et al. 2012). Por último, recientemente, *Peveling-Oberhag y col.* identificaron un subgrupo de 12 miRNAs con expresión diferencial entre LEZM y bazo no tumoral, asociando la expresión de *miR-29b* con la presencia de VHC (Peveling-Oberhag et al. 2012).



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La ausencia de criterios claros y reproducibles, como alteraciones cromosómicas características o marcadores moleculares específicos en LZMG, dificulta el diagnóstico de la enfermedad frente a otros linfomas B de bajo grado en el ganglio, especialmente frente al LF y frente a condiciones reactivas (Piris et al. 2011). Adicionalmente a esta dificultad, la patogénesis molecular de LZMG sigue siendo esencialmente desconocida y su perfil de expresión molecular, tanto en genes como en miRNAs, no ha sido caracterizado hasta la fecha.

Por tanto, la hipótesis global de este estudio es que la caracterización molecular del LZMG mejorará nuestro conocimiento de la enfermedad y con ello podremos a su vez facilitar el diagnóstico de los pacientes con LZMG. Para la consecución de esta hipótesis se han marcado una serie de **objetivos**:

1. Estudio del perfil de expresión génica de LZMG.
2. Estudio del patrón de expresión de miRNAs en LZMG.
3. Identificación de marcadores moleculares específicos de LZMG que faciliten el diagnóstico de la enfermedad frente al LF.
4. Identificación de marcadores moleculares específicos de LZMG que mejoren el diagnóstico frente a los otros subtipos de linfomas de la zona marginal.
5. Estudio de la expresión de genes y rutas implicadas en inflamación y su relación con LZMG.
6. Determinación de dianas de aplicación terapéutica en LZMG.



MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Procedencia de las muestras

Todas las muestras fueron seleccionadas de los casos de rutina y consulta de los Servicios de Anatomía Patológica y Genética del Hospital Virgen de la Salud de Toledo (HVS), del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO, Madrid) y de la Red Española de Banco de Tumores. Los casos fueron diagnosticados en base a la morfología, al inmunofenotipo, y a características moleculares de acuerdo a los criterios presentes en la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Swerdlow et al. 2008). La obtención de muestras y datos clínicos se llevó a cabo bajo la supervisión de la Comisión Ética del HVS de Toledo.

1.1.- Muestras de tejido congelado para estudios moleculares de expresión génica, de miRNAs y de alteraciones del número de copias incluyendo 48 ganglios linfáticos y 38 piezas de esplenectomía, correspondientes a 71 muestras tumorales y a 15 controles:

- LZMG: 15 muestras.
- Para comparar con otros linfomas B de célula pequeña en el ganglio, se incluyeron 16 LF, 5 LZM-MALT y 4 LEZM (LEZM-G).
- Para comparar frente a otros linfomas de la zona marginal se incluyó una serie de 31 piezas de esplenectomía con el diagnóstico de LEZM.
- Como control se utilizaron 8 muestras de ganglios linfáticos con hiperplasia folicular reactiva (GLR) y 7 bazos con hiperplasia reactiva (BHR).

1.2.- Serie para validación por inmunohistoquímica y PCR cuantitativa a tiempo real incluyendo 208 muestras fijadas en formol e incluidas en parafina:

- LZMG: 61 muestras.
- Con fines comparativos se incluyeron muestras de 57 LF y 77 LEZM.
- Como control se incluyeron 7 casos diagnosticados como GLR y 6 BHR

1.3.- Células B aisladas de 6 amígdalas procedentes de amigdalectomías no tumorales, con las cuales se seleccionaron:

- Células B de memoria, definidas como: CD38^{bajo}, IgD^{bajo}, CD27⁺ y CD10⁻.
- Células B de Centro Germinal: CD38^{alto}, IgD⁻, CD27⁺ y CD10⁺.

2.- Pacientes

La serie analizada estaba formada por 9 varones y 6 mujeres, con una media de edad de 69.2 años. Nueve de los 15 casos se diagnosticaron en estadíos avanzados de la enfermedad y recibieron tratamiento con quimioterapia. Dos de ellos murieron a consecuencia de la enfermedad. Dos casos fueron positivos para VHC, casos 9 y 11.

3.- Metodología

3.1.- Selección de células B: las dos subpoblaciones de células B, células B de memoria (CBM) y células B de centro germinal (CG) se aislaron a partir de las muestras de seis pacientes sometidos a amigdalectomía rutinaria. Las células tonsilares fueron recuperadas a partir de tejido fresco por disgregación mecánica, y la suspensión celular resultante se pasó a través de un tamiz. Utilizando el reactivo Ficoll se creó un gradiente de densidad que permitió eliminar un pequeño número de eritrocitos y células polimorfonucleares. Las células mononucleares obtenidas se lavaron en tampón fosfato salino (PBS) y se resuspendieron en PBS con 0,5% de suero fetal de ternera (FCS). Ambas subpoblaciones de células B se aislaron por separación de bolas magnéticas utilizando el sistema Miltenyi MicroBeads (Miltenyi Biotech). La pureza de las fracciones aisladas se determinó usando un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson). Todas las tinciones se realizaron en PBS, 0,5% de FCS en hielo y todas las separaciones celulares con *microbeads* magnéticos se llevaron a cabo en cámara fría con PBS enfriado en hielo. Las células CD19⁺ se enriquecieron por selección positiva en columnas de selección del kit Multisort de células B.

Para aislar las células B de centro germinal se incubaron las células mononucleares resultantes del Ficoll con *microbeads* marcadas con anti-CD38 (relación 1:1,000) para facilitar la selección de células B de centro germinal con CD38^{alto}. La pureza de la fracción aislada se determinó con tinciones de CD38, IgD, CD27 y CD10.

Las fracción celular CD38^{bajo} fue incubada con *microbeads* marcadas con anti-CD27 obteniendo las células B de memoria. En este caso, la pureza de la fracción aislada se determinó con tinciones de CD38 y CD27.

Los anticuerpos monoclonales específicos utilizados en este ensayo fueron anti-CD19 (clon 4G7), anti-IgD (Clon IA6-2), anti-CD27 (clon M-T271), anti-CD38 (clon HIT2) e IgM (Clon del G-20-127) de BD Biosciences y BD Pharmingen (San Jose, CA). Anti-CD10 (Clone 97C5) de Miltenyi Biotec (Colonia, Alemania).

3.2.- Extracción de ADN y ARN: para los estudios moleculares llevados a cabo en microarrays de ADNc y de miRNAs, se aisló ARN total de cada subtipo de células B, de 71 bloques congelados tumorales y 15 muestras control procedentes de ganglios con hiperplasia linfoide reactiva y bazo reactivo, utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La calidad de los ARN extraídos se comprobó por electroforesis en geles de agarosa al 1% y su concentración se cuantificó en el *Nanodrop-1000* (NanoDrop Technologies Inc.). Los casos con mala calidad del ARN fueron descartados.

Los estudios de alteración del número de copias (ANC) se hicieron en microarrays de CGH a partir del ADN de 15 casos de tejido congelado con LZMG, que se extrajo utilizando el protocolo estándar de fenol-cloroformo.

Para la validación de los datos de microarrays por PCR cuantitativa, tanto en expresión génica como en miRNAs, se aisló el ARN total de una serie independiente y más amplia de muestras fijadas en formol e incluidas en parafina, comprendiendo 61 casos de LZMG, 57 muestras de LF, 77 LEZM, 7 casos diagnosticados como GLR y 6 con BHR incluidos como control. Esta extracción se hizo utilizando el kit comercial *RNeasy FFPE Kit* (Qiagen).

3.3.- Estudios de expresión génica por microarrays de ADNc: el ARN total de cada subpoblación de células B y de los 86 bloques de tejido congelado (71 tumorales y 15 controles) se hibridó en microarrays comerciales de Agilent para estudios de expresión génica, denominados *Whole Human Genome Agilent 4x44K Oligonucleotide Microarray* (Agilent Technologies) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante, como se describe brevemente a continuación:

1. Síntesis de ADNc, ARNc, amplificación y marcaje: el ADN complementario (ADNc) se sintetizó a partir de 1 µg de ARN total utilizando la enzima MMLV-RT. Con la enzima T7 ARN polimerasa se sintetizó ARN complementario (ARNc) a partir del ADNc, amplificando e incorporando fluorocromos (Cianina 5-CTP, azul, para las muestras problema; y Cianina 3-CTP, rojo, para las muestras de referencia) con el kit *Agilent's Low RNA Input Fluorescence Linear Amplification kit* (Agilent

Technologies). Como referencia se utilizó el *Universal Human Reference RNA* (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

- 2. Purificación, cuantificación y fragmentación del ARNc:** el ARNc marcado con fluorocromos fue purificado pasando por columnas, *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA, USA), cuantificado en el *Nanodrop-1000* (NanoDrop Technologies Inc.) y finalmente fragmentado con el kit *Gene Expression Hybridization Kit* (Agilent Technologies). Por último, 750 ng de ARNc marcado fue depositado en los cristales de las microarrays según las recomendaciones del fabricante.
- 3. Hibridación y lavado:** la hibridación se realizó en agitación durante 17 horas a 65°C, tras la cual, los cristales fueron lavados con las soluciones recomendadas por la casa comercial, *Gene Expression Wash Buffer* (Agilent Technologies), en condiciones de agitación: 1 minuto a temperatura ambiente con la solución 1 y 1 minuto a 37°C con la solución 2. Después de los lavados, los cristales se pasaron por acetonitrilo (99.8%) durante 1 minuto como solución de secado. Todo el proceso de lavado se llevó a cabo en un entorno libre de ozono.
- 4. Lectura y obtención de datos:** inmediatamente después del secado, los cristales fueron escaneados usando el *Axon Gene Pix 4100A Scanner* (Axon Instruments Inc). Las imágenes obtenidas en el escáner se analizaron con el programa *GenePix 6.0* (Axon Instruments Inc), el cual permite identificar cada punto de la imagen con la sonda impresa correspondiente. Aquellos puntos no reconocidos por el programa fueron excluidos del análisis. Los datos obtenidos se incorporaron a una matriz numérica donde cada valor correspondió al ratio de fluorescencia entre los dos canales (5-CTP/3-CTP).

3.4.- Estudio del perfil de expresión de miRNAs por microarrays: de igual modo que para los estudios de expresión génica, el ARN total de cada subpoblación de células B y de los 86 bloques de tejido congelado (71 tumorales y 15 controles) se hibridó en microarrays comerciales de Agilent para estudios de expresión de miRNAs, *Human miRNA Microarray (V1, 8 x 15K)* (Agilent Technologies), según el protocolo recomendado por el fabricante, como se describe a continuación:

- 1. Tratamiento con fosfatasa, desnaturalización y marcaje:** 100 ng de ARN total se trataron con fosfatasa CIP (fosfatasa intestinal de ternera, Agilent) incubando a 37°C durante 30 minutos. El ARN defosforilado volvió a incubarse con dimetil sulfóxido (DMSO) a 100°C durante 7 minutos para desnaturalizar el ácido nucleico, tras lo cual, las muestras se pusieron inmediatamente en hielo.

Incubando durante 2 horas en bloque frío (16°C) con la enzima T4-RNA ligasa se marcó el ARN incorporando Cianina 3-pCp. Todas las enzimas, búferes y reactivos utilizados forman parte del kit comercial *miRNA Complete Labeling and Hyb Kit* (Agilent Technologies).

2. Purificación y secado: las muestras marcadas fueron purificadas pasando por columnas, *Bio-spin 6 columns* (BioRad, Hercules, CA, USA), para eliminar los restos de DMSO y la cianina sin incorporar al ARN. Tras la purificación, el pellet de las muestras fue secado completamente incubando a 50°C durante 30 minutos y resuspendido en agua. Al ARN resultante se le añadió suspensión bloqueante (*10X GE Blocking Agent*, Agilent) y bufer de hibridación (*2X Hi-RPM Hybridization Buffer*, Agilent) calentando a 100°C durante 5 minutos y pasando inmediatamente después las muestras a hielo. Por último, el ARN marcado fue depositado en los cristales de las microarrays según las recomendaciones del fabricante. De igual modo, todos los búferes y reactivos utilizados forman parte del kit comercial *miRNA Complete Labeling and Hyb Kit* (Agilent Technologies).

3. Hibridación y lavado: la hibridación se realizó en agitación durante 20 horas a 55°C, tras la cual, los cristales fueron lavados con las soluciones recomendadas por la casa comercial, *Gene Expression Wash Buffer* (Agilent Technologies), en condiciones de agitación: 5 minutos a temperatura ambiente con la solución 1 y 5 minutos a 37°C con la solución 2. Finalmente los cristales se pusieron en los soportes para el escaneado. Todo el proceso de lavado se llevó a cabo en un entorno libre de ozono.

4. Lectura y obtención de datos: inmediatamente después de los lavados, los cristales fueron escaneados usando el escáner *Agilent G2565AA Microarray Scanner System* (Agilent Technologies). Las imágenes obtenidas en el escáner se analizaron con el programa *Feature Extraction v9.5 software* (Agilent Technologies), que permite identificar cada punto de la imagen con la sonda impresa correspondiente. Aquellos puntos no reconocidos por el programa fueron excluidos del análisis. Los datos obtenidos se incorporaron a una matriz numérica donde cada valor correspondió a la fluorescencia de la Cianina 3-pCp.

3.5.- Análisis de número de copias (ANC) por microarrays de CGH: el ADN extraído de las serie de 15 casos de LZMG se hibridó en microarrays de Agilent diseñadas para el análisis de número de copias, *Agilent Human Genome CGH Microarray Kit 4 x 44K* (Agilent Technologies). Un pool de ADN comercial, masculino y

femenino, se utilizó para normalizar los resultados, los cuales se consideraron valorables en 14 de los 15 casos. Para la hibridación se siguió el protocolo recomendado por el fabricante, brevemente descrito a continuación:

- 1. Fragmentación, marcaje y purificación:** 1 µg de ADN se incubó 10 minutos a 95°C para su fragmentación pasando después por hielo 3 minutos. Tras la fragmentación, el ADN se incubó a 85°C durante 30 minutos con ULS-Cy5 para las muestras problema y con ULS-Cy3 para el ADN de referencia usando el kit *Genomic DNA ULS labeling kit*, (Agilent). Por último, las muestras se volvieron a poner en hielo durante 3 minutos y se purificaron pasando por columnas para eliminar los restos de fluorocromos sin incorporar (*Genomic DNA 96-well Purification Module*, Agilent).
- 2. Hibridación y lavado:** el ADN marcado y purificado se mezcló con Cot-1 DNA y agente bloqueante 100X (*Oligo aCGH Hybridization Kit*, Agilent) y se desnaturalizó a 95°C durante 3 minutos, tras lo cual las muestras se incubaron 30 minutos a 37°C. Después de una pequeña centrifugación para eliminar las burbujas de aire, las muestras fueron depositadas en las microarrays e incubadas a 65°C en agitación (20 rpm) durante 24 horas. Los arrays se liberaron de la cámara de hibridación en un entorno libre de ozono y se lavaron según las especificaciones de Agilent: 5 minutos en el bufer 1 a temperatura ambiente y 1 minuto en el bufer 2 a 37°C (*Oligo aCGH Wash Buffer 1 y 2*, Agilent). Por último, los cristales se pasaron durante 10 segundos por acetonitrilo (99.8%) como solución de secado y estabilizadora.
- 3. Lectura y obtención de datos:** inmediatamente después de los lavados, los cristales fueron escaneados usando el escáner *Agilent G2565AA Microarray Scanner System* (Agilent Technologies). Las imágenes obtenidas en el escáner se analizaron con el programa *Feature Extraction v9.5 software* (Agilent Technologies). Los puntos no reconocidos fueron excluidos del análisis. Los datos obtenidos se incorporaron a una matriz numérica donde cada valor correspondió al ratio de fluorescencia entre los dos canales (5-CTP/3-CTP).

3.6.- Análisis de datos de microarrays: expresión génica, miRNAs y ANC: para la normalización, el procesado y el análisis de los datos de microarrays, tanto de expresión génica como de mRNAs y de ANC, se utilizaron diversas herramientas y programas de análisis de datos:

- GEPAS: *Gene Expression Patterns Analysis Suite*, web de análisis de datos en expresión génica, en su versión 4.0 (www.gepas.org).
- Entorno R: entorno de programación para análisis y visualización de datos (<http://cran.r-project.org/>).
- POMELO II: web de análisis de datos de microarrays (www.pomelo2.bioinfo.cnio.es) englobada dentro de ASTERIAS, la web de análisis de datos en genómica del CNIO de Madrid.
- GSEA: *Gene Set Enrichment Analysis*, software de análisis para enriquecimiento de rutas metabólicas y grupos funcionales de genes (www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp).
- EXPANDER: *EXpression Analyzer and DisplayER*, programa de análisis y visualización de datos de expresión génica (www.acgt.cs.tau.ac.il/expander).
- CAPweb: *Copy number Array analysis Platform on the web*, web de análisis genómico de número de copias, en su versión 2.0, perteneciente al *Institut Curie* de París (Francia) (<http://bioinfo-out.curie.fr/CAPweb>).

1. Normalización y procesamiento de datos en expresión génica: la normalización de la matriz de datos en expresión génica, la eliminación del efecto fondo y el preprocesado se hicieron con las herramientas de normalización y preprocesado del GEPAS. La normalización se llevó a cabo según el método *print-tip loess*, y en el preprocesado, los datos fueron transformados a escala logarítmica (base 2) ajustando las sondas impresas por duplicado a su mediana, eliminando aquellas sondas con datos no valorables en al menos el 30% de la distribución y desestimando los replicados inconsistentes. Tras este proceso quedaron 30.592 genes con los que se realizó el análisis posterior.

2. Normalización y procesamiento de datos de miRNAs: se llevó a cabo una normalización inter-array usando la mediana y una segunda normalización intra-array con el percentil al 75% utilizando un *Script* desarrollado en el entorno R por la unidad de bioinformática del CNIO (Madrid). Tras la normalización se obtuvo una matriz de datos compuesta por 534 sondas con las que se analizó el perfil de expresión de miRNAs.

3. Análisis de perfiles de expresión génica y de miRNAs: se realizó un agrupamiento jerárquico no supervisado (herramienta de agrupamiento del GEPAS denominada *clustering*), combinando diversos métodos (UPGMA, *Nearest-Neighbor* y SOTA) y distancias (coeficiente de correlación de Pearson y distancia euclídea) obteniendo agrupamientos muy similares. Este análisis mostró que tanto el perfil

de expresión génica como el de miRNAs era muy homogéneo a lo largo de toda la serie de linfomas estudiados.

Para estudiar los perfiles de expresión y de miRNAs del linfoma de la zona marginal nodal, se realizaron una serie de análisis comparando este subtipo de linfoma frente su contrapartida no tumoral, frente a los otros subtipos de linfoma de la zona marginal (esplénico y de tipo MALT) cuando infiltran el ganglio o el bazo y frente al linfoma folicular (también en el ganglio) utilizando las herramientas *t* de *student* (para comparar 2 clases) y *Anova* (cuando se compararon más de 2 clases) en POMELO II. También se compararon los perfiles de expresión génica y de miRNAs de las células B de memoria frente a células B de centro germinal. En todas las comparaciones se consideró significativo los valores de $FDR < 0.05$.

El software GSEA (estadístico *t*) fue utilizado para identificar rutas metabólicas y grupos funcionales de genes enriquecidos en LZMG, LF, LEZM y en las dos subpoblaciones de células B, de memoria y de CG. Los *gene set* utilizados fueron seleccionados a partir de diversas bases de datos de rutas metabólicas (Biocarta, KEGG y CCG). Los grupos de genes con valores de $p < 0.05$ y $FDR < 0.25$ se consideraron enriquecidas y por tanto potencialmente relevantes. Además, este programa se utilizó para determinar la relación entre miRNAs deregulados y rutas metabólicas a través de una correlación de *Pearson*, considerando significativo valores de $FDR < 0.05$.

4. Correlación entre perfiles de expresión génica y de miRNAs: para los miRNAs deregulados, tanto sobreexpresados como reprimidos ($FDR < 0.05$), se obtuvieron aquellos genes que potencialmente podrían estar regulando, conocidos como genes diana. Los genes considerados como diana potencial de un miRNA, aparecieron al menos en dos algoritmos de predicción informática de los cinco utilizados:

- TargetScan: <http://www.targetscan.org/>
- miRNA.org: <http://www.microrna.org/>
- PicTar: <http://pictar.mdc-berlin.de>
- Diana Lab microT: <http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/>
- miRDB: <http://mirdb.org/>

Los genes obtenidos fueron filtrados eliminando aquellos que no pertenecían a la firma molecular de expresión génica ($FDR < 0.05$). Para identificar si estas parejas miRNA-gen diana obtenidas en la predicción informática no se debían al

azar y realmente se correspondían con asociaciones estadísticamente significativas entre los miRNAs diferencialmente expresados y genes pertenecientes a la firma, se realizaron tablas de contingencia para cada pareja miRNA-gen aplicando el *test exacto de Fisher* considerando relevantes aquellas asociaciones con $p\text{-valor} < 0.05$.

5. Análisis de los datos de ANC, ganancias y pérdidas: los datos de ANC fueron normalizados en CAPweb, versión 2.0. Las regiones comúnmente afectadas fueron estudiadas en la base de datos on-line *Database of Genomic Variants* (<http://projects.tcag.ca/variation>), de modo que aquellas regiones con una superposición de más del 80% entre sondas y variaciones de número de copias ya conocidas se consideraron variaciones de número y fueron excluidas de los análisis posteriores.

3.7.- Validación por PCR cuantitativa a tiempo real qRT-PCR: para validar los datos de microarrays, tanto expresión génica como miRNAs, se llevó a cabo un ensayo de PCR cuantitativa a tiempo real qRT-PCR utilizando sondas TaqMan (Applied Biosystems). En este ensayo se estudiaron los niveles de expresión de los genes y los miRNAs más relevantes encontrados en los datos de microarrays, incluyendo su expresión en cada subpoblación de célula B.

1. Síntesis de ADN complementario (ADNc):

- Expresión génica: partiendo de 1 µg de ARN total se sintetizó ADNc en una reacción de transcripción inversa en presencia de la enzima *SuperScript II* (Invitrogen). Las muestras se desnaturalizaron a 65°C durante 5 minutos junto con dNTPs y un cebador (hexámeros). Tras la desnaturalización se preparó la reacción de transcripción añadiendo una mezcla de la enzima, DTT, un inhibidor de ribonucleasas (*RNasin*) y tampón de PCR. Se incubó el conjunto 10 minutos a temperatura ambiente y 50 minutos a 42°C. Por último se inactivó la enzima manteniendo las muestras durante 15 minutos a 70°C. El ADNc resultante se almacenó a -20°C hasta su utilización posterior.
- miRNAs: para cada miRNA estudiado por qRT-PCR se sintetizó su correspondiente ADNc específico, partiendo de 10 ng de ARN total utilizando el kit *MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems). Este kit contiene dNTPs, tampón de PCR, inhibidor de ribonucleasas (*Rnase inhibitor*) y la transcriptasa inversa *MultiScribe RT*. Específicamente para cada miRNA, se añadió el primer 5X correspondiente incubando después 30 minutos a 16°C y 30 minutos a 42°C. Finalmente se paró la reacción calentando a 85°C durante

5 minutos. De nuevo el ADNc resultante se almacenó a -20°C hasta su utilización posterior.

2. qRT-PCR con sondas TaqMan: tanto para la validación de genes como de miRNAs, se utilizó la química basada en sondas TaqMan. Estas sondas liberan un fluoróforo (*reporter*, FAM) que emite fluorescencia al separarse del “apagador” (*quencher*, TAMRA) en cada ciclo de amplificación. De este modo, el grado de amplificación de la reacción se mide en función de la fluorescencia de este *reporter* que a su vez permite evaluar el nivel de expresión del gen o del miRNA estudiado. En la reacción se utilizó la mezcla 2X comercial *PCR Master Mix* (Applied Biosystems) y un primer 20X específico para cada gen o cada miRNA marcado con el fluoróforo. La reacción se llevó a cabo en el *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Todas las muestras se pusieron por triplicado para minimizar la variabilidad debida a la técnica.

3. Análisis de datos: los resultados se analizaron con el programa *SDS 7500 Fast* (Applied Biosystems) donde el grado de cambio para cada gen y cada miRNA fue valorado según el método $RQ=2^{-\Delta Ct}$, utilizando como controles endógenos el gen *GAPDH* en expresión génica y el RNA nuclear *RNU6B* en miRNAs. Los valores de Ct mayores de 36 se eliminaron del análisis.

- Expresión génica: $\Delta Ct = Ct_{gen} - Ct_{GAPDH}$
- miRNAs: $\Delta Ct = Ct_{miRNA} - Ct_{RNU6B}$

Los datos de RQ obtenidos se compararon mediante *t-test* (comparando 2 clases) o *ANOVA* (comparando 3 o más clases) en el software SPSS v17.0, considerando significativo valores de $p < 0.05$.

3.8.- Inmunohistoquímica: algunos de los genes más relevantes de la firma molecular del LZMG se estudiaron por Inmunohistoquímica (IHQ) en una serie independiente de muestras fijadas con formol e incluidas en parafina. Para ello, se utilizaron secciones de 2-4 μm según el procedimiento *En Vision FLEX* de DAKO automatizado en el *TechMate* (DAKO). Las proteínas estudiadas fueron CD82, TACI, CD44, CHIT1, TOM1 y LASS4 (Tabla 5).

1. Protocolo experimental: los cortes se desparafinaron durante 12 horas a 36°C, para después hidratarse paulatinamente: primero en xilol (10 minutos), después 5 minutos en diluciones de etanol de concentración decreciente (100%, 95% y 70%) y por último en agua (2 minutos). Los cortes se sometieron a altas temperaturas en olla a presión para el desenmascaramiento antigénico, en una

solución de citrato sódico a pH=6. La solución comercial S2023 (DAKO) se utilizó para inhibir la acción de la peroxidasa endógena incubando durante 5 minutos. Los cristales fueron incubados con la dilución óptima de anticuerpo primario (ver tabla 5) y de polímero de dextrano con anticuerpos secundarios (ratón + conejo) y enzima peroxidasa. El cromógeno utilizado para la visualización fue la diaminobenzidina. Los cortes se incubaron en hematoxilina durante 5 minutos y se lavaron con agua. Después se deshidrataron con dos pases sucesivos de 30 segundos en etanol (95% y 100%) y se aclararon durante 60 minutos en xilol.

2. Análisis de resultados: los casos fueron evaluados semicuantitativamente con respecto al número de células positivas y con respecto a la intensidad de la expresión. Aquellos anticuerpos que produjeron resultados inconsistentes no fueron cuantificados (CD82, TACI, y TOM1). Se consideró CD44-positivo y LASS4-positivo si existía una expresión media-alta en más del 50% de las células tumorales; mientras para CHIT1 se consideró positivo si existía tinción intensa en más del 10% de los macrófagos.

Tabla 5. En la siguiente tabla se detallan los anticuerpos utilizados en el estudio de IHQ.

Gen	Clon	Laboratorio
CD82	Ratón anti-humano CD82 (clon 5B5, IgG2a)	Abcam
TACI	Cabra anti-humano TACI (policlonal, IgG)	RD Systems
	Ratón anti-humano TACI (clon 165609, IgG1)	Lifespan
	Conejo anti-humano TACI (policlonal, IgG)	Lifespan
CD44	Ratón anti-humano CD44/H-CAM (clon DF1485, IgG1)	Novastra
CHIT1	Conejo anti-humano CHIT1 (policlonal, IgG)	Atlas Antibody
TOM1	Ratón anti-humano TOM1 (monoclonal, IgG1)	Abcam
LASS4	Conejo anti-humano LASS4 (policlonal, IgG)	Abcam



RESULTADOS

RESULTADOS

1.- Caracterización molecular del Linfoma de la zona marginal ganglionar (LZMG)

En este estudio se caracterizó la firma molecular de genes y de miRNAs del LZMG. La expresión de una selección de genes y de miRNAs se validó en una serie más grande e independiente de muestras incluidas en parafina por RT-PCR cuantitativa. Los genes diana (potencialmente regulados) de cada uno de los miRNAs seleccionados también fueron identificados.

1.1.- Perfil de expresión génica por microarrays de ADNc: se determinó el perfil de expresión génica en LZMG utilizando un análisis de agrupamiento o *clustering* incluyendo los 48 casos de la serie de ganglios linfáticos: 15 LZMG, 8 GLR, 16 LF, 5 LZM-MALT y 4 LEZM-G. Un primer *cluster* jerárquico no supervisado reveló un perfil de expresión relativamente homogéneo en toda la serie de LZMG, ya que la mayoría de los casos LZMG fueron agrupados en grupos bien separados. La mayoría de los casos LF y GLR también agruparon en ramas independientes (Figura 7). Los perfiles de expresión de los ganglios linfáticos infiltrados por LZMG, LZM-MALT y LEZM-G fueron comparados sin encontrar genes diferencialmente expresados, aunque en el análisis de estos datos se debe tener en cuenta el pequeño número de muestras analizadas en LZM-MALT y LEZM-G.

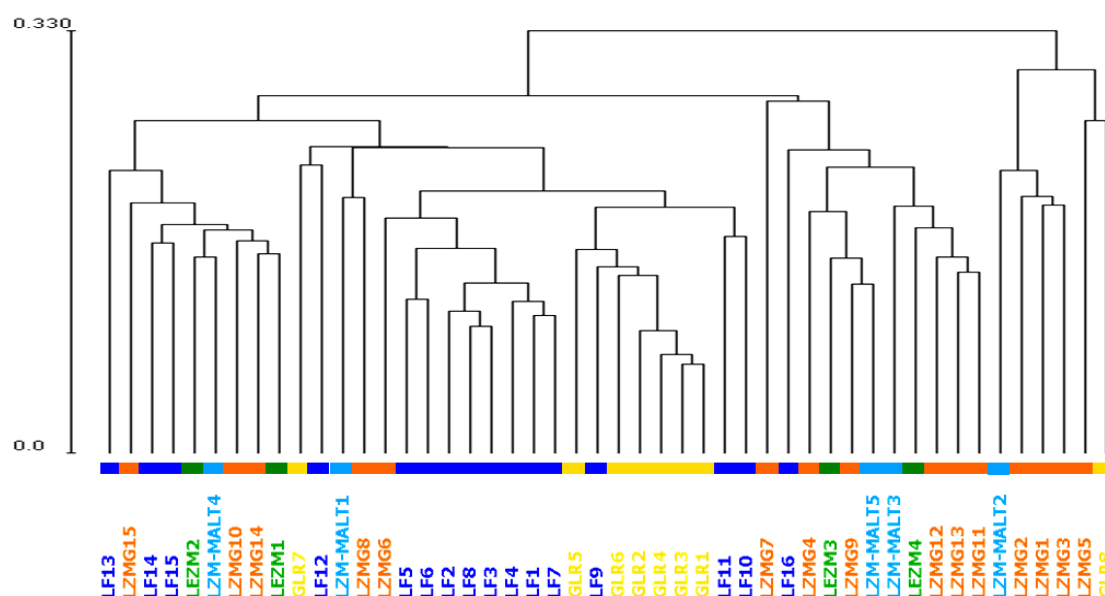


Figura 7. *Cluster* no supervisado. Para analizar la heterogeneidad de las muestras se realizó un agrupamiento no supervisado de toda la serie en la web de análisis on line GEPAS 4.0 (<http://gepas.bioinfo.cipf.es>). Después del pre-procesamiento, se dispusieron de 30.592 genes. El grupo se obtuvo mediante el método UPGMA con significación determinada por el coeficiente de correlación de *Pearson*. Se utilizaron diferentes algoritmos de *clustering*, como *Nearest-Neighbor* o *SOTA*, y con diferentes coeficientes, distancia euclídea y coeficiente de *Pearson*. Todos los algoritmos produjeron agrupaciones similares.

Se identificó la firma de expresión génica en LZMG comparando los casos tumorales frente a los ganglios reactivos mediante un *cluster* jerárquico supervisado que agrupó 264 genes sobreexpresados y 184 reprimidos (Figura 8). Los genes más relevantes en la firma LZMG se muestran en la Tabla 6 y en la Figura 8. Los 10 genes más sobreexpresados son *SYK*, *TACI*, *CD74*, *CD82*, *CDC42EP5*, *TFEB*, *LYN*, *UCP2*, *ACP5*, y *HLA-DMA*. Entre los genes más reprimidos encontramos genes relacionados con proliferación y ciclo celular (*CD2AP*, *PBK*, y *CDC7*), reparación del ADN (*RAD54B*, *PSMC3IP*, *MSH2*), centro germinal (*CD10*), meiosis (*MND1*, *MNS1*), modificación de cromatina (*HDAC2*), apoptosis celular (*BNIP3*, *IKIP*), y matriz extracelular y adhesión celular (*ANXA1*, *LMO7*).

Tabla 6. Firma molecular en LZMG, genes más relevantes de la firma. N Exp corresponde a la diferencia de expresión entre las medias de las clases: LZMG vs GLR, LZMG vs LF y células B de memoria (CBM) y de centro germinal (CG), todos los datos expresados en escala logarítmica (\log_2). FDR (false discovery rate) y p-valor corresponden a los valores de la prueba *t* de *student* (<http://pomelo2.bioinfo.cnio.es/>). NS: no significativo, NV: no valorable.

Gen	LZMG vs GLR		LZMG vs LF		CBM vs CG		Citobanda	Descripción
	N Exp	FDR	N Exp	FDR	N Exp	p-valor		
TACI	2.075	0.032	1.987	0.042	0.925	<0,001	17p11.2	Receptor de TNF, estimulación de célula B, activador de NF- κ B.
CHIT1	2.044	NS (0.072)	2.527	0.020	-0.234	NS	1q31-q32	Microambiente estromal
CD82	2.045	0.012	1.727	0.027	0.399	NS	11p11.2	Coactivador de la ruta de señalización de BCR
CHI3L1	1.588	0.028	1.635	0.029	0.133	NV	1q32.1	Microambiente estromal
PRKD2	1.766	0.006	1.537	0.007	0.374	NV	19q13.32	Respuesta inmune adaptativa, activador de NF- κ B
CLPTM1	1.652	0.009	1.334	0.049	0.249	NV	19q13.32	Activación de linfocitos
PTPN1	1.487	0.008	1.243	0.026	0.245	NV	20q13.13	Transducción de señales
IRF3	1.401	0.011	1.125	0.029	0.520	NV	19q13.33	Respuesta inmune, regulación de NF- κ B
TRAF4	1.036	0.033	1.139	0.022	-0.110	NV	17q11.2	Factor asociado al receptor de TNF. Activación de NF- κ B
PIK4CB	1.194	0.019	1.067	0.017	0.436	NV	1q21.2	Transducción de señales
TGFB1	1.175	0.010	1.009	0.025	0.371	NS	19q13.2	Proliferación celular y diferenciación
CD44	0.874	0.029	1.285	0.006	1.131	NS	11p13	Molécula de adhesión relacionada con la zona marginal normal
SMAD2	-0.837	0.010	-0.712	0.030	0.000	NV	18q21.1	Señalización de TGFB
HDAC2	-1.258	0.007	-1.016	0.013	-0.171	NV	6q22.1	Modificación de cromatina
IKIP	-1.428	0.029	-1.270	0.045	-0.179	NV	12q23.1	Apoptosis
RAD54B	-1.775	0.007	-1.291	0.026	-0.241	NS	8q22.1	Reparación del ADN
SMAD3	-2.447	0.029	-1.226	0.044	0.335	NV	6q23.1	Señalización de TGFB
LMO2	-2.533	0.006	-1.732	0.014	-0.545	NS	11p13	Marcador de centro germinal
LEF1	-2.828	0.009	-1.768	0.021	1.682	NV	4q25	Transcripción de la expresión génica
CD10	-4.269	0.006	-2.172	0.041	-0.612	NV	3q32.31	Marcador de centro germinal

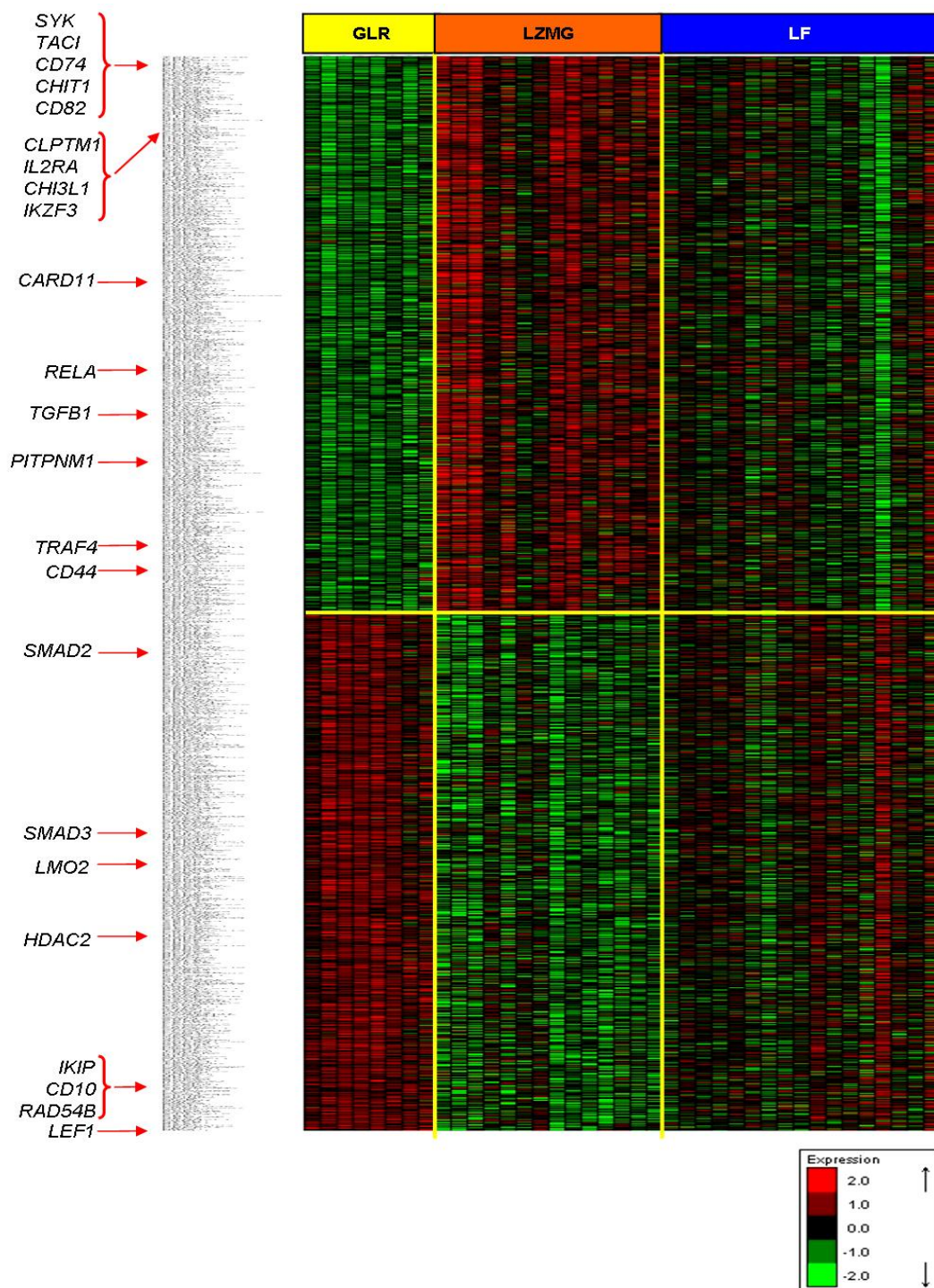


Figura 8. Perfil de expresión génica en LZMG. *Cluster* jerárquico de los genes con $FDR < 0,10$ en un *t-test* comparando LZMG con GLR. Algunos genes relevantes de la firma están marcados con flechas rojas. Rojo y verde representan alta y baja expresión respectivamente.

El análisis de GSEA reveló rutas enriquecidas significativamente al comparar LZMG con GLR, incluyendo genes relacionados con IL6, integrinas, IL2, IL2RB, CD40, RAC-CYCD, TGFB, PtdIns (PIK3C2A), RELA y TNFR1 (Tabla7, Figura 9).

Tabla 7. Análisis de enriquecimiento de rutas en expresión génica. Las rutas consideradas enriquecidas tuvieron valores de p-valor<0.05 y FDR (false discovery rate)<0.250 en el análisis de GSEA (*t*-test) comparando LZMG frente a GLR.

Rutas y grupos de genes	p-valor	FDR	Genes sobreexpresados
Ruta de señalización de IL6	0.004	0.177	<i>SHC1, JAK1, CSNK2A1, RAF1, STAT3, JUN, HRAS, MAPK3, GRB2</i>
Integrinas	0.006	0.135	<i>BCR, RAF1, ZYX, JUN, CAPNS1, CSK, MAP2K2, HRAS, MAPK3, GRB2, RAPGEF1, CAPN1</i>
Ruta de señalización de IL2RB	0.004	0.152	<i>SHC1, PTPN6, IL2RA, JAK1, SYK, RAF1, CFLAR, SOCS1, BAD, AKT1, BCL2L1, HRAS, MAPK3, IKZF3, GRB2, CSNK2A1, JUN</i>
Señalización de CD40 durante el desarrollo del centro germinal	0.028	0.202	<i>KCNN4, BTG2, CARG, LYN, LITAF, IRF5, DUSP2, JUNB, CD44, IRF4, CD74, NF-KB2, IFI30, ADAM8, TNF</i>
Señalización de RAC y CYCD	0.021	0.210	<i>RELA, HRAS, MAPK3, CDKN1A, AKT1, RAF1, CDK4</i>
Señalización de TGFB	0.023	0.210	<i>MAP3K7IP1, EP300, MAPK3, TGFB1</i>
Ruta de señalización de PTD INS	0.028	0.195	<i>PFKM, GSK3B, VAV2, AP2A1, BAD, AKT1, PFKL, ARF1, AP2M1, LYN</i>
Ruta de señalización de IL2	0.030	0.197	<i>SHC1, PTPN6, IL2RA, JAK1, SYK, RAF1, CFLAR, SOCS1, BAD, AKT1, BCL2L1, HRAS, MAPK3, IKZF3, GRB2, CSNK2A1, JUN</i>
Señalización de RELA	0.042	0.203	<i>RELA, EP300, IKBKG, TNF, HDAC3, FADD, TRADD</i>
Señalización de TNFR1	0.023	0.214	<i>MADD, JUN, LMNA, DFFB, SPTAN1, CASP2, PRKDC, TNF, TRADD, ARHGD1B, MAP3K1, FADD</i>

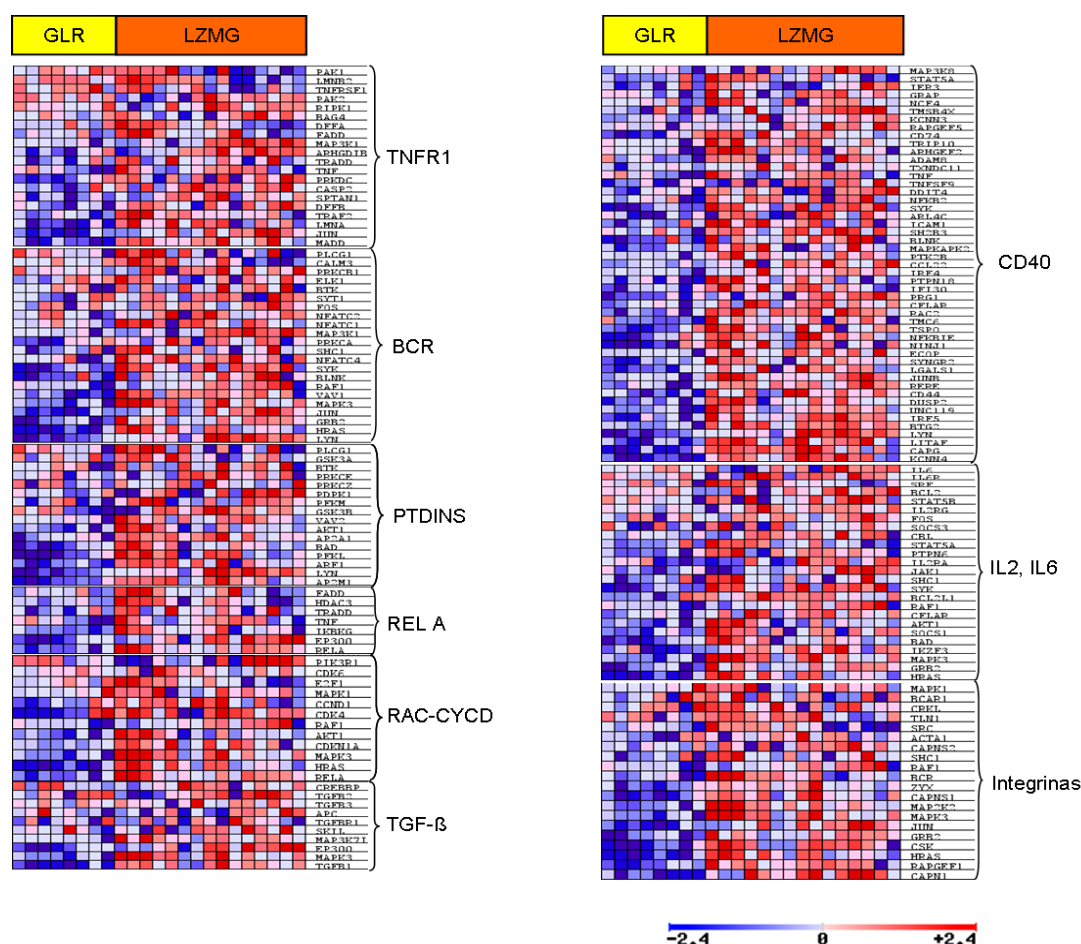


Figura 9. Rutas y grupos de genes enriquecidos en LZMG. El análisis de GSEA (t -test) muestra la expresión de genes pertenecientes a distintas rutas de célula B. Rojo y azul representan elevada y baja expresión. GLR: ganglio linfático reactivo; LZMG: linfoma de la zona marginal ganglionar.

1.2.- Perfil de miRNAs por microarrays: la firma de miRNAs, obtenida al comparar LZMG con ganglios reactivos (GLR) mediante prueba t de *student* mostró 4 miRNAs significativamente deregulados, 3 de ellos sobreexpresados (*miR-221*, *miR-555* y *miR-29c*) y uno reprimido (*miR-532-5p*). Los genes diana potencialmente regulados por *miR-221* y *miR-555* incluyeron los genes reprimidos *LMO2* y *CD10*, mientras que *miR-532-5p* podría estar regulando la expresión de los genes sobreexpresados *SYK*, *LYN*, y *RELA* (Tabla 8, Figura 10). En el análisis de GSEA, la sobreexpresión de *miR-221*, *miR-555* y *miR-29c* mostró enriquecimiento significativo de rutas de genes relacionados con NF-κB, PtdIns, señalización de BCR, señalización de TGFB, TNFR, interleuquinas 2 y 6, y CD40, entre otros.

Tabla 8. Firma de miRNAs en LZMG. N Exp corresponde a la diferencia de expresión entre las medias de las clases: LZMG vs GLR, LZMG vs LF y células B de memoria (CBM) y de centro germinal (CG), todos los datos expresados en escala logarítmica (\log_2). FDR (false discovery rate) y p-valor corresponden a los valores de la prueba *t* de *student* (<http://pomelo2.bioinfo.cnio.es/>). La columna de ANC (Análisis de Número de Copias) corresponde a las alteraciones cromosómicas halladas por microarrays de CGH en las citobandas correspondientes. NS: no significativo, NV: no valorable.

miRNA	LZMG vs GLR		LZMG vs LF		CBM vs CG		Citobanda	ANC	Dianas putativas
	N Exp	FDR	N Exp	FDR	N Exp	p-valor			
<i>miR-223</i>	0.298	NS	0.978	0.009	1.023	NS (0.054)	Xq12		<i>LMO2, MYBL1</i>
<i>miR-29c</i>	0.809	0.031	0.188	NS	1.081	<0.001	1q32.2		<i>PTEN, PLAG1, GNB4, MEST</i>
<i>miR-221</i>	0.562	0.002	0.430	0.009	1.057	NS	Xp11.3	ganancia	<i>CD10, LMO2</i>
<i>miR-34a</i>	0.432	NS	0.494	0.024	0.992	NV	1p36.22	ganancia	<i>LEF1, LASS6, GRSF1, E2F3</i>
<i>let-7f</i>	0.109	NS	0.809	0.008	1.020	<0.05	9q22.32		<i>SMAD2, LBR, CCDC100</i>
<i>miR-625</i>	0.396	0.092	0.447	0.002	1.010	NV	14q23.3		<i>PAG1, SFRS1, BAT3, ABCF3</i>
<i>miR-222</i>	0.330	NS	0.052	NS	1.025	NV	Xp11.3	ganancia	<i>MYO10</i>
<i>miR-202</i>	0.320	NS	-0.036	NS	1.045	NV	10q26.3	ganancia	<i>MYCBP, LEPROTL1, STX17</i>
<i>miR-765</i>	-0.207	NS	-1.491	0.000	0.990	NV	1q23.1		<i>TGFB1</i>
<i>miR-370</i>	-0.221	NS	-1.961	0.000	0.960	NV	14q32.2		<i>TRAF4</i>
<i>miR-513</i>	-0.230	NS	-2.226	0.000	0.939	NV	Xq27.3		<i>DRAP1, SMARCA1, HMGB1</i>
<i>miR-494</i>	-0.937	NS	-2.969	0.000	0.989	<0.001	14q32.31		<i>CCND2, ASL, PMPCA, BCL6</i>

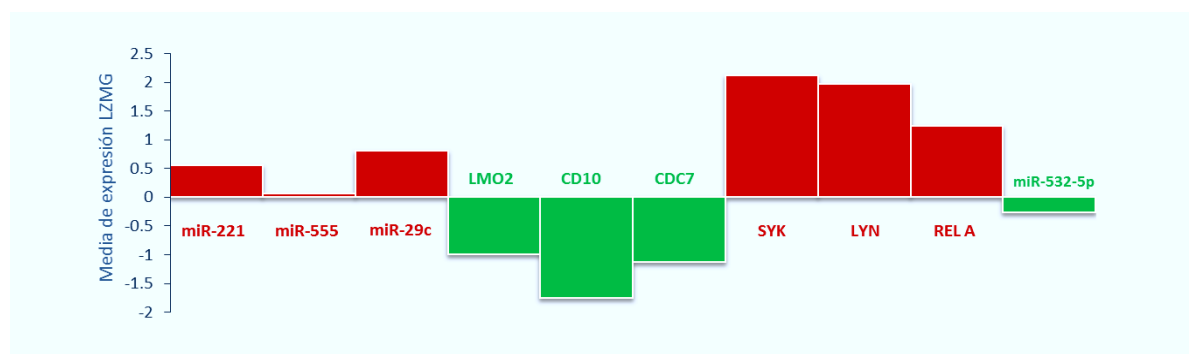


Figura 10. El análisis de *t*-test con los datos de microarrays identificó únicamente 4 miRNAs con FDR<0.05 (<http://pomelo2.bioinfo.cnio.es/>), tres de ellos sobreexpresados en LZMG (*miR-221*, *miR-155* y *miR-29c*) y uno reprimido (*miR-532-5p*). En la figura se representan las medias de expresión en LZMG de estos miRNAs y de sus genes diana putativos. En rojo, se representa la sobreexpresión y en verde la represión.

1.3.- Análisis de número de copias (ANC) por microarrays de CGH en LZMG: el análisis de número de copias reveló ganancias en diversas localizaciones cromosómicas y permitió el estudio de las relaciones entre estos datos y los de expresión génica y miRNAs (Tabla 9, Figuras 11 y 12). En la citobanda 22q13.32-q13.33 se encontraron ganancias en 4 casos (29%) involucrando a las quinasas *MAPK11*, *MAPK12* y *MAPK8IP2*. Cabe destacar la ganancia observada en las localizaciones de los genes *ADM2* y *CRELD2* (22q13.33) en un 67% de los pacientes. Dos de 14 casos presentaron ganancias en 14q32.33 (73.8Kb), aunque dentro de esta misma zona, concretamente en el *locus* del gen relacionado con linfoma *AKT1*, se encontró ganancia en 5/14

pacientes. El cromosoma X presentó dos áreas de ganancia, Xq28 y Xp11.23. Xq28 mostró ganancias en 5 de 14 casos (36%) incluyendo al regulador de NF-kB, *IKBKG*; mientras que en Xp11.23 se observó ganancia en 2 casos (14%) incluyendo a la fosfoproteína *OTUD5*, involucrada en la regulación del sistema inmune (Kayagaki et al. 2007). Las bandas teloméricas 10q26.13 (*GALNAC4S-6ST*, implicado en la activación de BCR (Verkoczy et al. 2000)), 16p13.3 (*IL32*, citoquina de señalización de NF-kB (Kim et al. 2005)) y 17q25.3 (*RAB40B*, *RAC3*, *SYNGR2*) mostraron ganancias en 4 casos (29%). La banda 1p36.33-p36.31 mostró también ganancia en el 14% de los pacientes, implicando al ligando de Notch *MIB2* que podría tener un papel importante en la diferenciación de las células B de la zona marginal (Song et al. 2008).

Tabla 9. Localizaciones cromosómicas alteradas en microarrays de CGH. La columna de genes involucrados muestra los genes localizados en la citobanda correspondiente. Aquellos genes marcados con asterisco (*) obtuvieron un valor de FDR<0.05 en el *t*-test LZMG vs GLR.

Banda	Alteración	Frecuencia (%)	Genes involucrados
22q13.32-33	Ganancia	4-8/14 (29-67%)	<i>MAPK11</i> , <i>MAPK12</i> , <i>MAPK8IP2</i> , <i>ADM2</i> , <i>CRELD2</i> , <i>CHKB*</i> , <i>SBF1*</i>
14q32.33	Ganancia	5/14 (36%)	<i>AKT1</i>
Xq28	Ganancia	5/14 (36%)	<i>IKBKG</i> , <i>IRAK1</i> , <i>TAZ*</i>
10q26.13	Ganancia	4/14 (29%)	<i>GALNAC4S-6ST</i> , <i>INPP5A</i> , <i>ADAM8</i>
16p13.3	Ganancia	4/14 (29%)	<i>IL32</i> , <i>RHOT2*</i> , <i>BAIAP3</i> , <i>RAB40C*</i>
17q25	Ganancia	4/14 (29%)	<i>RAB40B</i> , <i>RAC3</i> , <i>FOXK2</i> , <i>SYNGR2*</i> , <i>WBP2*</i>
16q21-24	Ganancia	3/14 (21%)	<i>PLCG2*</i>
1p36	Ganancia	2/14 (14%)	<i>MIB2*</i> , <i>SDF4*</i>
6p21.33	Ganancia	2/14 (14%)	<i>HLA-DMA*</i> , <i>HLA-E*</i> , <i>HLA-H*</i> , <i>HLA-A*</i> , <i>HLA-B*</i> , <i>NEU1</i> , <i>NF-KBIL1</i> , <i>LTB</i> , <i>TNF</i>
6p22.1	Ganancia	2/14 (14%)	Familia de genes <i>HIST1H2*</i>
8q24.3	Ganancia	2/14 (14%)	<i>LY6K</i> , <i>COMMD5</i> , <i>CYHR1</i> , <i>KIFC2</i> , <i>C8orf33</i>
Xp11.23	Ganancia	2/14 (14%)	<i>PIM2</i> , <i>OTUD5*</i>
11p15.5	Ganancia	2/14 (14%)	Familia de genes <i>IFITM</i>
22q11.21	Pérdida	2/14 (14%)	<i>PRAME</i> . Descrito como polimorfismo (CNV_53983, CNV_35989 and CNV_53720)

Se encontraron ganancias en dos regiones del cromosoma 6: 6p21.33 (14%) que contiene las moléculas HLA de clase I (*HLA-E*, *HLA-H*, *HLA-A*, *HLA-B*) y otros genes relevantes en célula B como *TNF*, *BAK1*, Linfotóxina beta (*LTB*) y *NF-kBIE*; y 6p22.1 (21%) donde se localiza el *cluster* 1 de histonas (*HIST1H2BJ*, *HIST1H2AG*, *HIST1H2BK*, *HIST1H2AH*). Además, en la banda 8q24.3 también se encontró ganancia en el 14% de los pacientes. Esta región contiene genes involucrados en la activación de NF-kB, como *COMMD5* (Burstein et al. 2005).

El análisis de ANC solamente encontró pérdidas cromosómicas en tumores aislados, incluyendo una pérdida particularmente interesante en 19p13.1-p12 que ha sido recientemente asociada con LZMG (Rinaldi et al. 2011) y donde se localiza el cluster KRAB de organización de homólogos, cuya expresión está aumentada en células T humanas (Bellefroid et al. 1993). Por último, se encontró una delección homocigota en la citobanda 22q11.21 (34.02 kb), donde se localiza el gen PRAME, descrito como polimorfismo (CNV_53983, CNV_35989 y CNV_53720). Sin embargo, esta última alteración puede también corresponder a los reordenamientos fisiológicos del gen lambda y a las deleciones causadas como consecuencia.

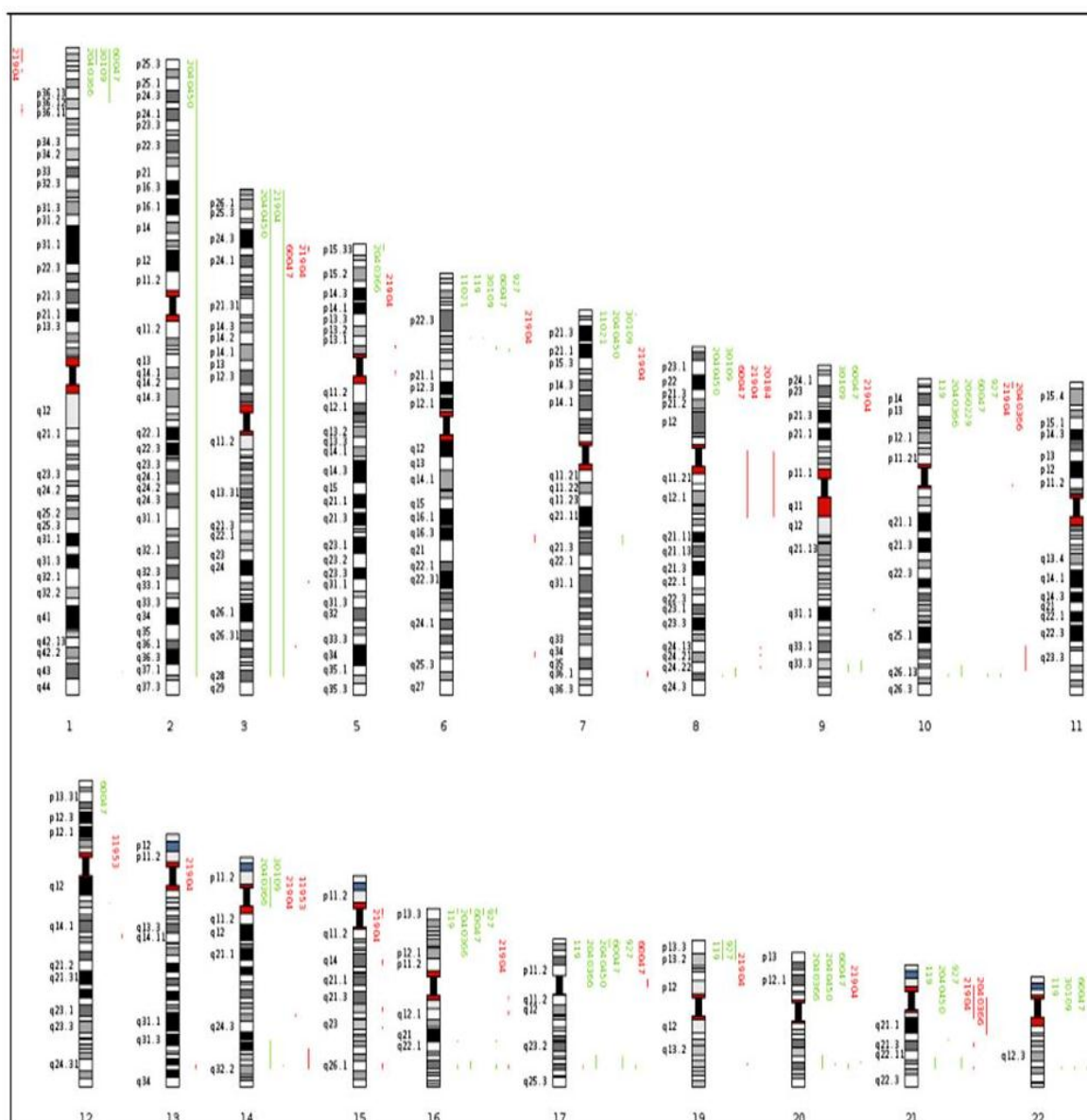


Figura 11. Ganancias y pérdidas por microarrays de CGH en la serie de LZMG. Ideograma que representa los desequilibrios cromosómicos de 14 casos con LZMG. Las regiones de pérdida y de ganancia se muestran con líneas verticales, a la izquierda en color rojo (pérdida) y a la derecha en color verde (ganancia). Las regiones con mayor amplificación se representan con líneas más gruesas.

Varios miRNAs con elevada expresión en LZMG se localizaron en bandas con ganancias en los datos de ANC: el *miR-202* se localiza en 10q26.13, en 1p36 se encuentran el *miR-34a* y el *miR-200a**, mientras que el *miR-221* y el *miR-222* se codifican en Xp11.3 (Figura 12).

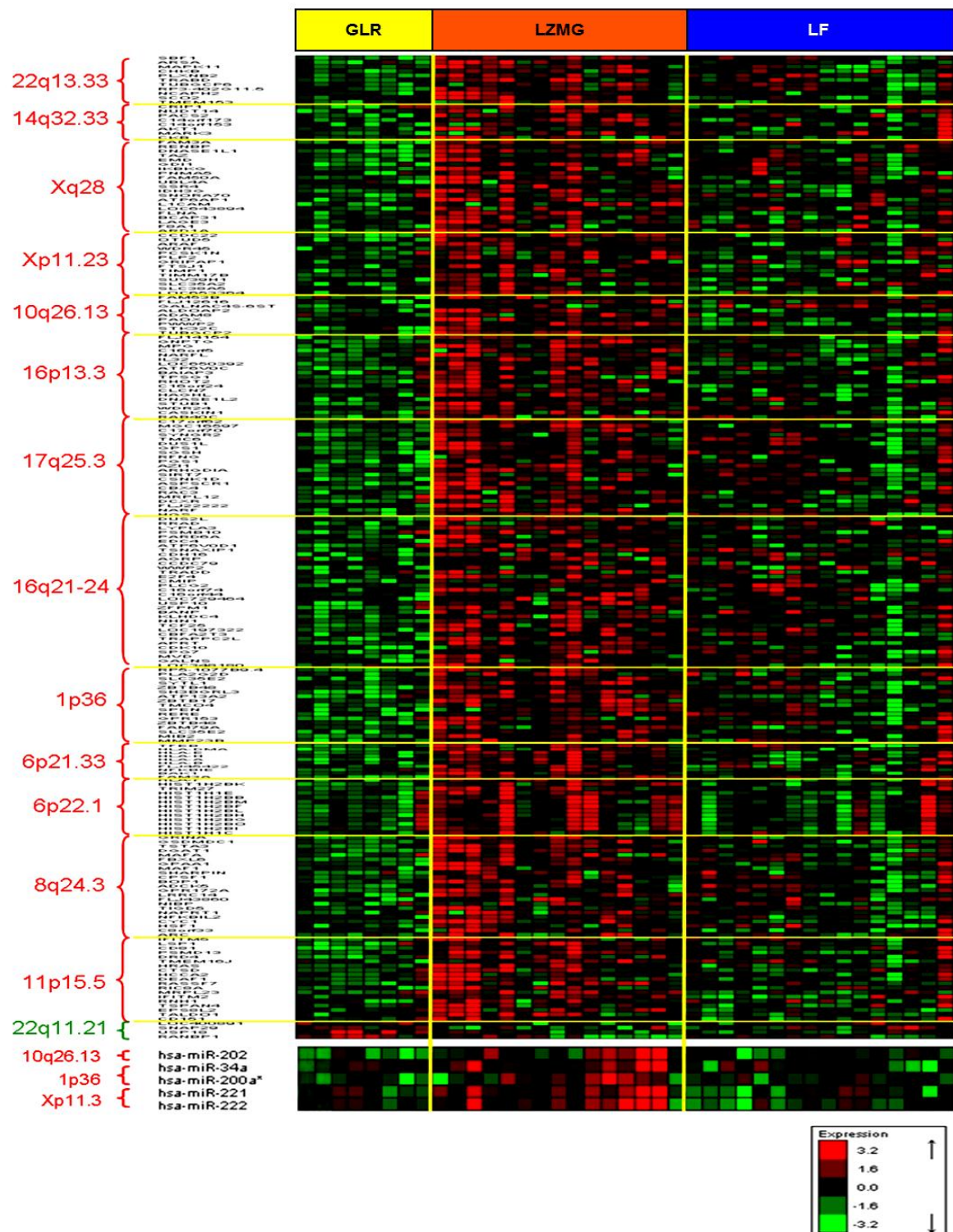


Figura 12. Agrupación jerárquica de genes y miRNAs localizados en las citobandas alteradas en el análisis de número de copias. Rojo y verde representan alta y baja expresión respectivamente.

2.- Diagnóstico diferencial del LZMG frente al Linfoma Folicular (LF)

En ocasiones, el diagnóstico diferencial entre LZMG y LF puede presentar problemas como consecuencia de la ausencia de marcadores moleculares específicos de LZMG. Debido a ello, los datos de microarrays obtenidos de 15 muestras de LZMG se compararon con 16 casos de LF, tanto en sus perfiles de expresión génica como en el de miRNAs. Se realizó igualmente la integración entre los perfiles de expresión génica y de miRNAs mediante un análisis de correlación de *Pearson*.

2.1.- Genes diferencialmente expresados entre LZMG y LF por microarrays de ADNc: un análisis supervisado de agrupamiento destacó una interesante serie de genes desregulados al estudiar una serie de 15 LZMG y 16 LF. En el LZMG aparecieron sobreexpresados los genes *CHIT1*, *TACI*, *TRAF4*, *TGFB1*, *CD82*, *PTPN1* y *CD44*, entre otros; mientras que en LF se encontraron con elevada expresión marcadores de centro germinal como *CD10* (*MME*), *BCL6*, *GCET1* (*SERPINA9*) y *LMO2*, entre otros. En contrapartida, en las muestras de LZMG aparecieron sobreexpresados genes relacionados con la zona marginal normal, incluyendo *TACI* y *CD44*; y genes implicados en la ruta de señalización de NF- κ B (*TRAF4*, *CD82*, *PRKD2*, *CLIC1*, *CSNK2B* y *VAR5*). Del mismo modo, *IL32*, histonas (varias isoformas de *HIST1H* e *HIST2H*), miembros de la superfamilia TNF (el mismo *TACI*, *MADD* y *TNFRSF14*) y genes implicados en desarrollo y diferenciación de linfocitos (*CLPTM1* y *TGFB1*), tuvieron una expresión significativamente más alta en LZMG que en LF (Tablas 6 y 10, Figura 8).

Tabla 10. Genes con expresión diferencial significativa entre LZMG y LF. La columna N Exp corresponde a la diferencia de expresión entre las medias de LZMG y LF, expresados en escala logarítmica (\log_2). FDR (false discovery rate) corresponde a los valores de la prueba *t* de *student* (<http://pomelo2.bioinfo.cnio.es/>).

N Exp	Gen	FDR	N Exp	Gen	FDR
3.0156	<i>ZBTB32</i>	0.0132	-1.1973	<i>FRY</i>	0.0125
2.5270	<i>CHIT1</i>	0.0204	-1.2685	<i>SCHIP1</i>	0.0467
2.2052	<i>ACP5</i>	0.0098	-1.2700	<i>IKIP</i>	0.0454
1.9870	<i>TACI</i>	0.0417	-1.2717	<i>P2RY12</i>	0.0106
1.7711	<i>ANXA6</i>	0.0109	-1.2725	<i>PLAG1</i>	0.0109
1.7618	<i>PREX1</i>	0.0059	-1.2908	<i>RAD54B</i>	0.0258
1.7269	<i>CD82</i>	0.0269	-1.2932	<i>SCRN1</i>	0.0176
1.6687	<i>RAC2</i>	0.0168	-1.3384	<i>CPE</i>	0.0429
1.6354	<i>CHI3L1</i>	0.0288	-1.3787	<i>BCL6</i>	0.0059
1.5626	<i>CSK</i>	0.043	-1.4362	<i>PPAPDC2</i>	0.0373
1.5392	<i>HIST1H1D</i>	0.0192	-1.4414	<i>SSBP2</i>	0.0059
1.5369	<i>PRKD2</i>	0.0075	-1.4767	<i>PLK2</i>	0.0166
1.5137	<i>TNFRSF14</i>	0.0059	-1.4775	<i>SYT17</i>	0.0213
1.4061	<i>HLA-E</i>	0.0478	-1.4972	<i>SLC25A27</i>	0.0271
1.3965	<i>RAB42</i>	0.0353	-1.5039	<i>LMO2</i>	0.0059
1.3886	<i>ICAM3</i>	0.0275	-1.6435	<i>ANUBL1</i>	0.0075
1.3436	<i>IL32</i>	0.0408	-1.7321	<i>BNIP3</i>	0.0447
1.2850	<i>CD44</i>	0.0059	-1.7492	<i>ANKRD15</i>	0.0098
1.2426	<i>PTPN1</i>	0.0258	-1.7675	<i>LEF1</i>	0.0207
1.1619	<i>HIST2H2AC</i>	0.0376	-1.7792	<i>CLDN23</i>	0.0248
1.1390	<i>TRAF4</i>	0.0217	-1.8563	<i>MYBL1</i>	0.0075
1.1250	<i>IRF3</i>	0.0288	-1.8636	<i>RPGR</i>	0.0374
1.0674	<i>PIK4CB</i>	0.0166	-1.9405	<i>BMP7</i>	0.034
1.0086	<i>TGFB1</i>	0.0255	-1.9539	<i>RGS13</i>	0.0109
0.9594	<i>HIST1H1E</i>	0.0235	-1.9705	<i>KCNMB4</i>	0.0059
0.9470	<i>MADD</i>	0.0098	-2.2693	<i>IQCD</i>	0.0118
0.9385	<i>CLPTM1</i>	0.0495	-2.9158	<i>GCET1</i>	0.0374
0.9369	<i>CCND2</i>	0.0447	-3.2068	<i>CD10</i>	0.0059

El análisis de enriquecimiento de rutas por GSEA comparando LZMG y LF reveló sobreexpresión en LZMG de genes relacionados con células B de memoria ($\text{IgM}^+ \text{IgD}^- \text{CD27}^+$) y genes de señalización de IL10, mientras que en LF se encontró expresión elevada de genes implicados en centro germinal (Figura 13).

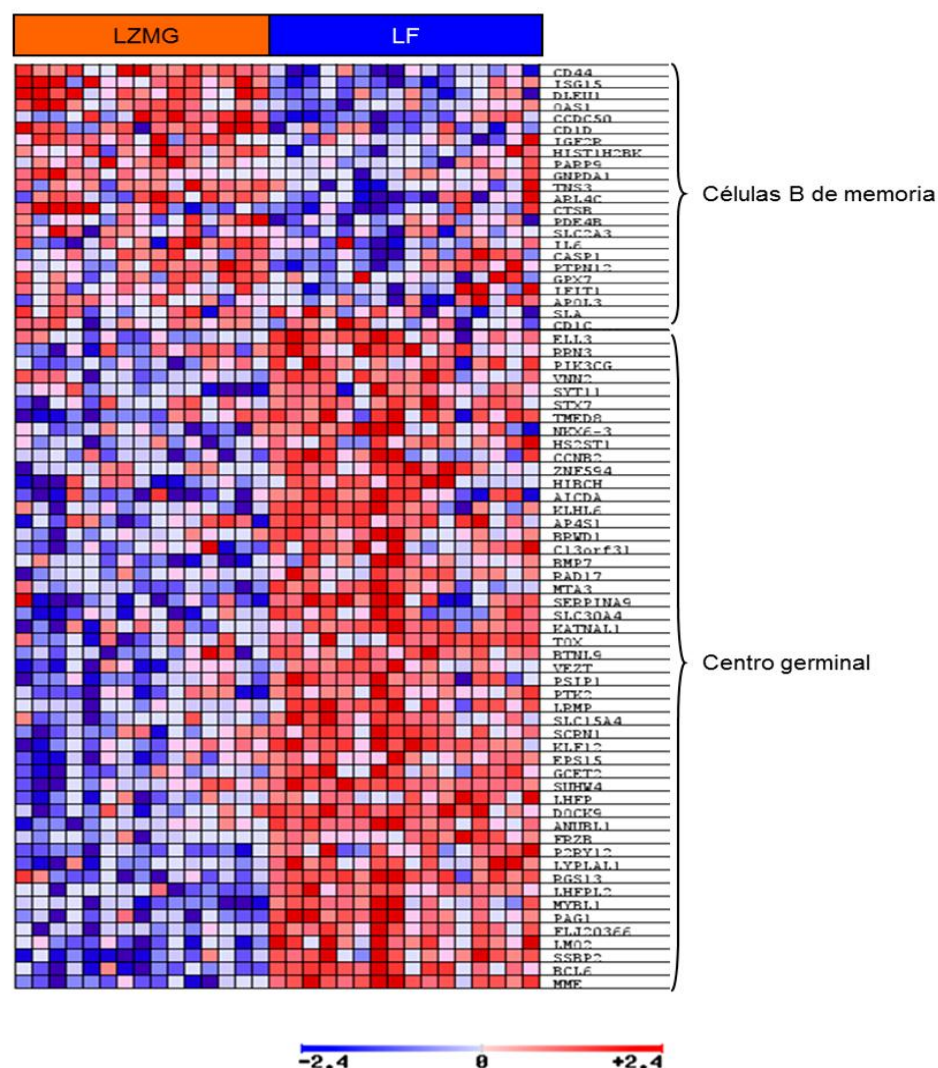


Figura 13. Expresión de células B en LZMG y LF. El análisis de GSEA mostró sobreexpresión de genes relacionados con células B de memoria (IgM^{alto} , IgD^{bajo} , $CD27^+$) en LZMG, mientras que genes involucrados en el centro germinal aparecieron con elevada expresión en LF. Rojo y azul indican altos y bajos niveles de expresión respectivamente. LZMG: linfoma de la zona marginal ganglionar; LF: linfoma folicular.

2.2.- MiRNAs diferencialmente expresados entre LZMG y LF por microarrays:

un análisis de t -test comparando LZMG y LF permitió identificar 61 miRNAs diferencialmente expresados, 24 de ellos sobreexpresados y 37 reprimidos en LZMG (Tablas 6 y 11, Figura 14). Entre los miRNAs sobreexpresados en LZMG se encontraron miRNAs como *miR-221*, *miR-223* y *let-7f*, que podrían regular la expresión de *CD10*, *LMO2* y de genes relacionados con ciclo celular respectivamente. La relación funcional entre *miR-223* y *LMO2* en células B ha sido ya descrita (Zhang et al. 2009). El *cluster let-7*, incluyendo a *let-7f*, está involucrado en la regulación del ciclo celular y en la división celular (Barh et al. 2010). Entre los miRNAs reprimidos destacaron *miR-494*,

miR-765, miR-370, miR-30d, miR-181a y miR-29b. MiR-370 y miR-765 podrían regular la expresión de *TRAF4* y *TGFB1* respectivamente, mientras que *CCND2* es una diana potencial de *miR-494* según los algoritmos de predicción *on line*.

Tabla 11. MiRNAs más relevantes con expresión diferencial significativa entre LZMG y LF. Los valores del estadístico y de FDR corresponden a un análisis de *t*-test entre LZMG y LF (<http://pomelo2.bioinfo.cnio.es/>). La predicción de genes diana para cada miRNA corresponde a genes pertenecientes a la firma molecular de LZMG según el algoritmo TargetScan.

miRNA	Estadístico	FDR	Predicción de genes diana (TargetScan)
<i>miR-621</i>	4.8095	0.0012	<i>BCL6, MYLK, LEF1</i>
<i>miR-625</i>	4.3017	0.0037	
<i>miR-374a</i>	4.1334	0.0056	<i>CD10, LMO2, BCL6</i>
<i>miR-100</i>	3.9706	0.0087	
<i>miR-10b</i>	3.9236	0.0091	
<i>miR-99a</i>	3.9039	0.0091	
<i>miR-9</i>	3.9039	0.0091	<i>CD10, BCL6</i>
<i>miR-126</i>	3.9033	0.0091	<i>PLK2</i>
<i>miR-223</i>	3.8643	0.0096	<i>LMO2, MYBL1</i>
<i>let-7g</i>	3.8428	0.0096	genes de ciclo celular
<i>miR-221</i>	3.7875	0.0109	<i>CD10, LMO2</i>
<i>let-7f</i>	3.4916	0.0213	genes de ciclo celular
<i>miR-30a</i>	3.4564	0.0228	<i>BCL6</i>
<i>miR-98</i>	3.3780	0.0267	
<i>miR-26b</i>	3.2674	0.0307	<i>LEF1</i>
<i>let-7d</i>	3.1104	0.0350	
<i>miR-29b</i>	-3.1723	0.0314	<i>TCL1A</i>
<i>miR-146a</i>	-3.1964	0.0314	
<i>miR-142-5p</i>	-3.2118	0.0312	
<i>miR-136</i>	-3.2324	0.0307	<i>TGFB1</i>
<i>miR-181b</i>	-3.5295	0.0198	
<i>miR-30d</i>	-4.5370	0.0020	
<i>miR-181a</i>	-4.6666	0.0015	
<i>miR-198</i>	-4.9200	0.0010	
<i>miR-765</i>	-5.0931	0.0007	<i>TGFB1</i>
<i>miR-138</i>	-5.2037	0.0005	
<i>miR-370</i>	-5.3652	0.0004	<i>TRAF4, CDKN1A</i>
<i>miR-617</i>	-6.1749	0.0001	
<i>miR-513</i>	-7.9292	<0.0001	
<i>miR-494</i>	-10.6070	<0.0001	<i>CCND2</i>

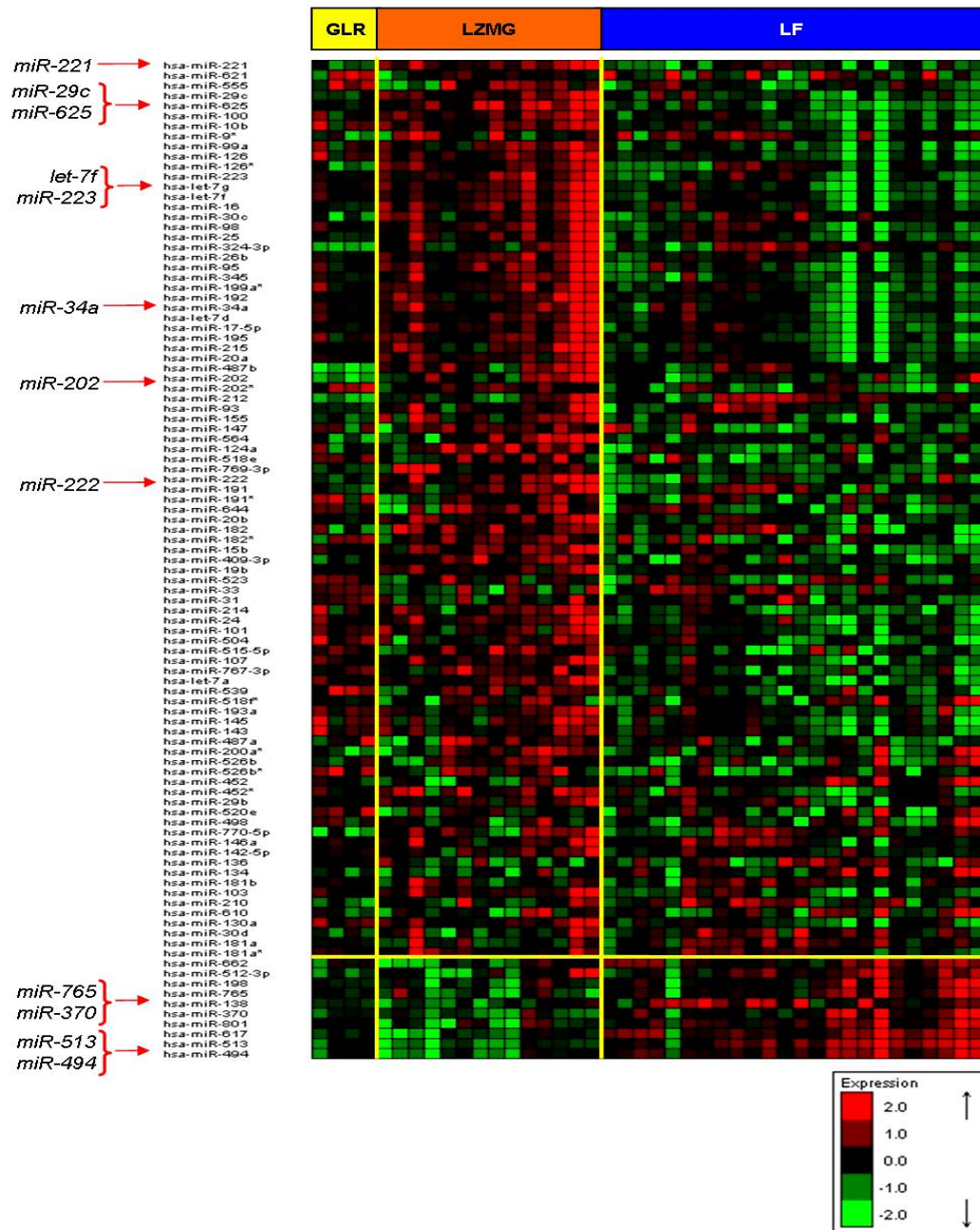


Figura 13. Perfil de expresión de miRNAs en LZMG. *Cluster* jerárquico de los miRNAs con $FDR < 0,05$ en un análisis de *ANOVA* comparando LZMG con GLR y LF. Algunos miRNAs relevantes de la firma están marcados con flechas rojas. Rojo y verde representan alta y baja expresión respectivamente.

3.- Diagnóstico diferencial de LZMG frente a Linfoma Esplénico de la Zona Marginal (LEZM)

El diagnóstico diferencial entre LZMG y LEZM puede ser difícil, teniendo en cuenta además que el diagnóstico de LZMG es un diagnóstico de exclusión. Por ello, los datos obtenidos en microarrays para 15 muestras de LZMG se compararon con 31 casos de LEZM, tanto en sus perfiles de expresión génica como en el de miRNAs.

3.1.- Genes diferencialmente expresados entre LZMG y LEZM por microarrays

de ADNc: un análisis de *t*-test permitió determinar un grupo de genes deregulados al estudiar una serie de 15 LZMG y 31 LEZM tras normalizar cada tumor frente a su tejido reactivo no tumoral. En ambos linfomas se observaron genes sobreexpresados relacionados con células B de memoria y con señalización de BCR. Además, se encontró un grupo de genes con expresión diferencial entre los dos subtipos de linfoma de la zona marginal, entre los que aparecieron genes pertenecientes a sus respectivas firmas moleculares: *CD81*, *CD82*, *TGFB1*, *PRKD2*, *PIK4CB*, *MAPK3*, *LYN* y *IRF3* en LZMG; y *TCL1B*, *AIM2*, *LEF1*, *RAD54B*, *BIRC3*, *UBD*, *E2F5* y *RHOH* en LEZM; entre otros. El análisis de GSEA mostró enriquecimiento en LZMG de genes relacionados con monocitos/macrófagos, mientras que en LEZM apareció enriquecida la ruta de señalización de las caspasas.

3.2.- MiRNAs diferencialmente expresados entre LZMG y LEZM: se compararon los perfiles de miRNAs de LZMG y LEZM mediante un *t*-test a partir de los datos de microarrays. Este análisis permitió determinar un grupo de 44 miRNAs diferencialmente expresados entre estos dos subtipos de linfoma, entre los que destacan *miR-199a* que apareció también sobreexpresado en LZMG frente a LF; y *miR-21*, *miR-155*, *miR-100*, *miR-330*, *miR-27b*, *miR-376a*, *miR-377* sobreexpresados en LEZM (Figura 15).

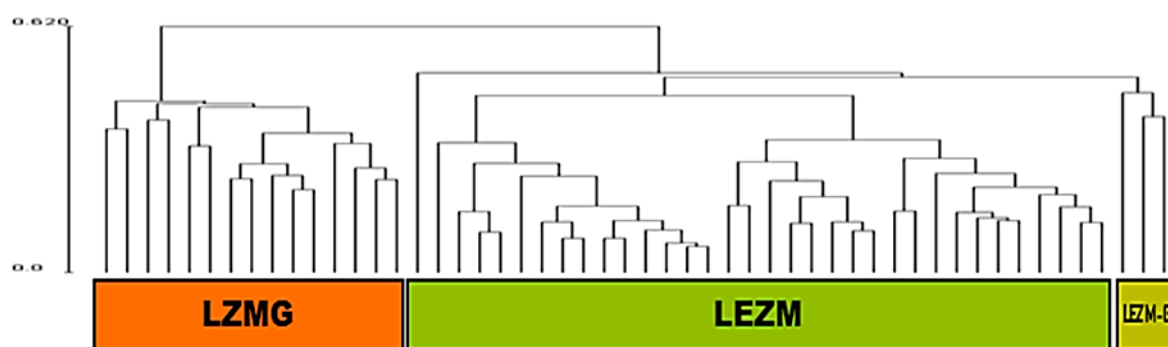


Figura 15. *Cluster* supervisado de la firma de miRNAs de LZMG que permite distinguir entre ganglios infiltrados por LZMG y LEZM (LEZM-G). El análisis se llevó a cabo en la suite *on-line* GEPAS 4.0 (<http://gepas.bioinfo.cipf.es/>) utilizando el algoritmo SOTA y el coeficiente de correlación de *Pearson*.

4.- Validación de los resultados de microarrays por PCR cuantitativa a tiempo real

Los resultados obtenidos en los ensayos de microarrays a partir de tejido congelado, fueron validados en una serie independiente y más amplia de muestras incluidas en parafina (FFPE) por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). Para ello se seleccionaron los genes y miRNAs más relevantes del estudio incluyendo aquellos con expresión diferencial significativa en las comparaciones LZMG frente a GLR y LZMG frente a LF. Por tanto se analizaron *TACI*, *CHIT1*, *CD82*, *TGFB1*, *CD44*, *IKIP*, *RAD54B* y *LMO2* para genes; y *miR-221*, *miR-223*, *miR-34a*, *miR-625*, *let-7f*, *miR-765*, *miR-370*, *miR-513* y *miR-494* para miRNAs (Tablas 6 y 8).

4.1.- Genes diferencialmente expresados entre LZMG, GLR y LF: el análisis de qRT-PCR mostró niveles de expresión más altos para los genes *TACI* y *CHIT1* en LZMG que en GLR y que en LF y niveles más bajos de expresión para *LMO2* y *RAD54B*, con valores estadísticamente significativos. Además, los genes *TGFB1*, *CD44* y *CD82* tuvieron expresión significativamente más alta en LZMG que en LF. Los resultados completos se muestran en la Figura 16 (a). Los datos de *IKIP* no pudieron ser evaluados debido a que la sonda TaqMan utilizada no amplificó.

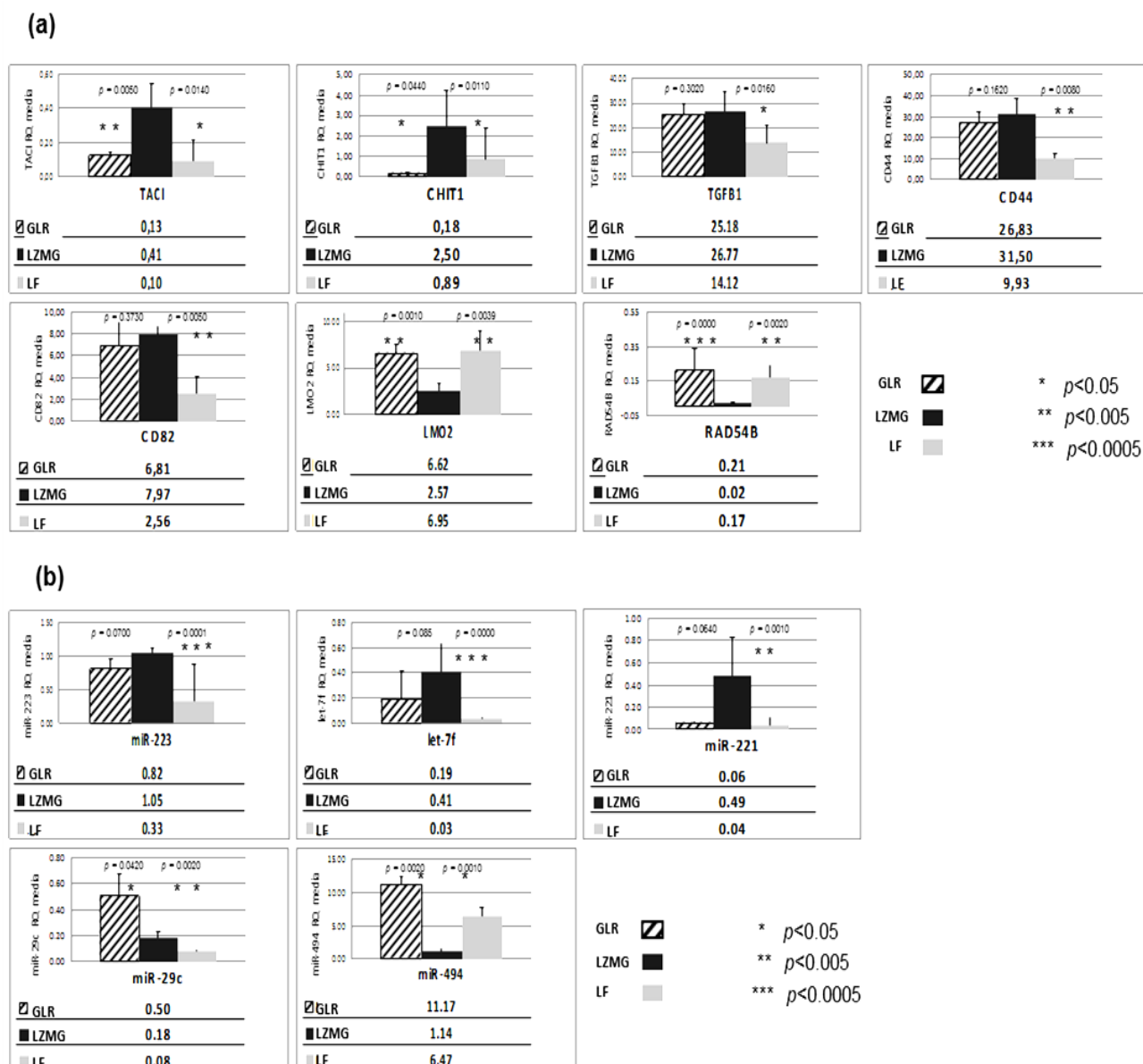


Figura 16. (a) ensayo para expresión génica; **(b)** estudio en miRNAs. Datos de expresión (media RQ) para los genes y los miRNAs validados por PCR cuantitativa en GLR, LZMG y LF. Los valores de RQ se muestran debajo de cada gráfica y los valores de p aparecen encima de las barras correspondientes a cada comparación. GLR en rayado oblicuo, LZMG en negro y LF en gris.

4.2.- MiRNAs diferencialmente expresados entre LZMG, GLR y LF: para los miRNAs, se confirmaron los patrones de expresión encontrados en el ensayo de microarrays para *miR-221*, *miR-223*, *let-7f* y *miR-494*. Sin embargo, en el caso de *miR-29c*, la PCR a tiempo real no pudo validar los resultados obtenidos previamente. Los datos de qRT-PCR de *miR-34a*, *miR-625*, *miR-765*, *miR-370* y *miR-513* fueron no valorables por la deficiente amplificación de sus respectivas sondas (Figura 16 (b)).

4.3.- Comparación conjunta entre los perfiles de expresión génica y de miRNAs en LZMG, GLR y LF: análisis de la varianza: los datos de qRT-PCR fueron sometidos a un análisis de la varianza (*ANOVA*) entre las tres clases incluidas en el ensayo (LZMG, LF y GLR) que mostró valores de p significativos para los genes más relevantes del estudio *TACI*, *CHIT1*, *TGFB1*, *CD44* y *CD82*, aunque *LMO2* y *RAD54B* obtuvieron valores no significativos, debido probablemente a que presentaron niveles de expresión muy similares en LF y GLR. En cuanto a los miRNAs, en un análisis similar al realizado en genes, los miRNAs *miR-221*, *let-7f* y *miR-494* tuvieron valores de $p < 0.05$, mientras que *miR-223* mostró una p no significativa, debido a que no se encontraron diferencias de expresión entre LZMG y GLR. Por último el *miR-29c* no tuvo valores significativos en esta prueba (Tabla 12).

Tabla 12. *ANOVA* de un factor (SPSS v.17.0) con los datos obtenidos por qRT-PCR en LZMG, LF y GLR comparando la expresión de los genes y los mRNAs más relevantes del estudio. Los genes y los miRNAs con $p < 0.05$ fueron considerados significativos. *LMO2* y *RAD54B*, que no aparecen en la tabla tuvieron valores no significativos. NS: no significativo.

Gen	p -valor	miRNA	p -valor
<i>TACI</i>	0.016	<i>miR-223</i>	NS
<i>CHIT1</i>	0.007	<i>let-7f</i>	0.049
<i>TGFB1</i>	0.047	<i>miR-29c</i>	NS
<i>CD44</i>	0.016	<i>miR-221</i>	0.047
<i>CD82</i>	0.020	<i>miR-494</i>	0.004

Por último, cabe señalar que la falta de validación en la comparación entre LZMG y GLR para algunos genes (*TGFB1*, *CD44* y *CD82*) y para el *miR-221* puede ser el resultado de los relativamente pocos casos de GLR incluidos en la serie de muestras parafinadas.

5.- Validación de los resultados de microarrays por Inmunohistoquímica (IHQ)

En el estudio de expresión de proteínas por inmunohistoquímica se incluyeron algunos de los genes más relevantes de la firma molecular, como *CD82*, *TACI*, *CD44*, *CHIT1*, *TOM1* y *LASS4*. La expresión proteica de *CD44* fue significativamente más alta en LZMG que en LF ($p=0.0157$), de forma que *CD44* fue positivo en el 90% de los casos mientras que en LF expresó en el 69% de las muestras. La expresión de *CHIT1*, presente en macrófagos pero no en células tumorales, fue más fuerte en LZMG (48%) que en LF (38%) aunque esta diferencia fue estadísticamente no significativa (Tabla 13, Figura 17). No se encontraron diferencias al comparar al LZMG con ganglios infiltrados por los otros

dos subtipos de linfoma de la zona marginal, LZM-MALT y LEZM, quizá debido a los pocos casos incluidos en el estudio para estos subtipos de LZM en ganglio.

Los anticuerpos comerciales probados para el gen *TACI* produjeron resultados inconsistentes. El anticuerpo de CD82 produjo tinción de los centros germinales en amígdalas y bazo reactivos pero no marcó la zona marginal. TOM1 y LASS4 mostraron expresión en células reactivas de la zona marginal en amígdala y bazo, mientras que las células de centro germinal fueron negativas. La frecuencia de expresión encontrada en LZMG para LASS4 fue más alta en LZMG que en LF, aunque de forma no significativa.

Tabla 13. Resumen de los anticuerpos incluidos en el ensayo de IHQ y de los resultados obtenidos. Abreviaturas: C.Com.: casa comercial; R.Cons.: resultados consistentes; ZM normal: zona marginal normal; CG: centro germinal, LZMG: linfoma de la zona marginal ganglionar; LF: linfoma folicular; NV: no valorable. (*) refleja diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Gen	Clon	C. Com.	R. Cons.	ZM normal	CG	LZMG	LF
CD82	Ratón anti-humano CD82 (clon 5B5, IgG2a)	Abcam	NO	–	+	NV	NV
	Cabra anti-humano TACI (policlonal IgG)	RD Systems	NO	NV	NV	NV	NV
TACI	Ratón anti-humano TACI (clon 165609, IgG1)	Lifespan	NO	NV	NV	NV	NV
	Conejo anti-humano TACI (policlonal IgG)	Lifespan	NO	NV	NV	NV	NV
CD44	Ratón anti-humano CD44/H-CAM (clon, DF1485, IgG1)	Novastra	SI	+	–	90%(*)	69%
CHIT1	Conejo anti-humano CHIT1 (policlonal IgG)	Atlas Antibody	SI	macrófagos	macrófagos	48%	38%
TOM1	Ratón anti-humano TOM1 (monoclonal, IgG1)	Abcam	NO	+	–	NV	NV
LASS4	Conejo anti-humano LASS4 (policlonal IgG)	Abcam	SI	+	–	27%	13%

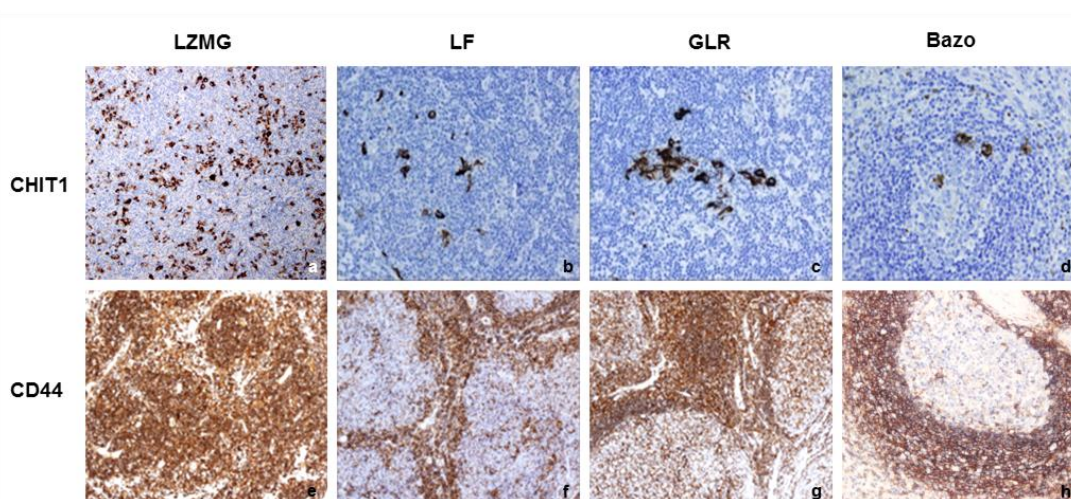


Figura 17. Expresión diferencial a nivel de proteína por IHQ para los anticuerpos CHIT1 y CD44 en LZMG, LF, GLR y Bazo no tumoral. Imágenes capturadas con una cámara Olympus DP72 3.0 en un microscopio Olympus AX80 con un objetivo de 400X, y procesadas con el programa Cell A software (Olympus Soft Imaging Solutions v3.2; Olympus, Tokio, Japón).

Por tanto, los resultados de la firma molecular obtenida en la comparación entre LZMG y GLR, se han validado en 4 de los 7 genes estudiados (*TACI*, *CHIT1*, *LMO2* y *RAD54B*) y en 1 de los 2 miRNAs seleccionados (*miR-221*). En el estudio para diagnóstico diferencial entre LZMG y LF se ha corroborado la expresión de todos los genes (7 de 7: *TACI*, *CHIT1*, *TGFB1*, *CD44*, *CD82*, *LMO2* y *RAD54B*) y todos los miRNAs (4 de 4: *miR-223*, *let-7f*, *miR-221* y *miR-494*) incluidos en el ensayo. Finalmente, la expresión del gen *CD44* frente al ganglio reactivo no pudo validarse por PCR cuantitativa, aunque si lo hizo por IHQ.

6.- Homología entre LZMG y células B de memoria (CBM)

Para determinar si la firma molecular de LZMG presenta homología con células B de memoria (CBM), se identificaron los patrones de expresión génica y de miRNAs de esta subpoblación celular y de las células B de centro germinal (CG). La comparación entre estos dos subtipos de célula B se muestra en las tablas Tablas 14 y 15.

Tabla 14. Genes más relevantes con expresión diferencial entre células B de memoria y células de centro germinal. La columna FC corresponde al *fold change*: diferencia de expresión entre las medias de CBM y CG, expresado en escala logarítmica (\log_2).

Gen	FC	Gen	FC	Gen	FC	Gen	FC
<i>IL7R</i>	1.8636	<i>CCR7</i>	0.9472	<i>CD40LG</i>	0.6784	<i>MYBL1</i>	-0.6155
<i>TCF7</i>	1.7629	<i>TACI</i>	0.9246	<i>IL17RA</i>	0.6716	<i>CD10</i>	-0.6241
<i>TNFRSF25</i>	1.5910	<i>IFI44</i>	0.8979	<i>ICAM3</i>	0.6709	<i>LMO2</i>	-0.7054
<i>FYB</i>	1.5500	<i>MAP3K5</i>	0.8960	<i>TNFRSF8</i>	0.6571	<i>PRDX4</i>	-0.7638
<i>IL32</i>	1.3967	<i>BCL2</i>	0.8468	<i>FYN</i>	0.6513	<i>CXCL9</i>	-0.8031
<i>TNFSF12</i>	1.2745	<i>PDCD1</i>	0.8035	<i>TNFRSF18</i>	0.6491	<i>GCET2</i>	-0.8797
<i>IL6R</i>	1.1998	<i>BCL11B</i>	0.7958	<i>RALGDS</i>	0.6433	<i>ST3GAL6</i>	-0.9255
<i>IL27RA</i>	1.1877	<i>IL2RB</i>	0.7741	<i>ADAM28</i>	-0.5609	<i>PRDM1</i>	-0.9893
<i>CCL5</i>	1.1087	<i>CDC42EP5</i>	0.7408	<i>BCL6</i>	-0.5615	<i>MMP9</i>	-1.2690
<i>CD44</i>	1.0697	<i>IL4</i>	0.7404	<i>SERPINA7</i>	-0.5980	<i>UBD</i>	-1.3682
<i>TNFSF14</i>	1.0079	<i>IL1R2</i>	0.7064	<i>CXCL12</i>	-0.6049	<i>MEST</i>	-1.3743

Entre los genes más relevantes sobreexpresados en CBM se encontraron interleuquinas (*IL2R*, *IL6R* e *IL32*), miembros de la familia TNF (*TNFRSF25*, *TNFSF12*, *TNFSF14*, *TNFRSF18* y *CD40L*) y genes ya descritos con elevada expresión en células B de memoria como *CD44*, *TACI*, *PTPNM1*, *CARD11* y *IKZF3* (Shen et al. 2004). Las células CG mostraron un incremento en la expresión de marcadores de centro germinal como *CD10*, *BCL6* y *LMO2*, y otros genes relacionados con proliferación en célula B como *MYBL1* y *CXCL9* (Tabla 14).

Los miRNAs más relevantes expresados diferencialmente entre CBM y CG contienen miRNAs ya descritos con elevada expresión en células B de memoria como *miR-150*, *miR-223*, *miR-29a*, *miR-29c*, *let-7b* y *miR-142-5p* (Basso et al. 2009, Jima et al. 2010) y otros miRNAs descritos en linfomas B de bajo grado como *miR-146* (a y b) o *let-7b* (Calin et al. 2005, Mi et al. 2007). Por su parte, las células CG mostraron sobreexpresión de diversos miRNAs ya descritos con elevada expresión en células de centro germinal como *miR-28*, *miR-17-5p*, *miR-181b*, *miR-331*, *miR-20* y *miR-15b* (Basso et al. 2009). Merece la pena mencionar que el desarrollo y la diferenciación de célula B están reguladas por *miR-150*, el cual está sobreexpresado en células B maduras pero no en sus progenitoras, lo que se corresponde con los hallazgos obtenidos en este trabajo (Xiao et al. 2007, Basso et al. 2009).

Tabla 15. MiRNAs más relevantes con expresión diferencial entre células B de memoria (CBM) y células de centro germinal (CG). La columna FC corresponde a la diferencia de expresión entre las medias de CBM y CG, expresados en \log_2 , en los datos de microarrays. Sobre Exp corresponde con el subtipo celular donde se encontró sobreexpresión.

miRNAs	FC	Sobre Exp	miRNAs	FC	Sobre Exp
<i>miR-146b</i>	5.3619	CBM	<i>miR-494</i>	-0.5410	CG
<i>miR-150</i>	4.5134	CBM	<i>miR-20b</i>	-0.8007	CG
<i>miR-29c</i>	4.3340	CBM	<i>miR-331</i>	-1.3802	CG
<i>miR-146a</i>	3.0998	CBM	<i>miR-15a</i>	-1.7217	CG
<i>let-7b</i>	3.0410	CBM	<i>miR-370</i>	-1.7472	CG
<i>miR-142-5p</i>	2.8451	CBM	<i>miR-324-5p</i>	-1.7596	CG
<i>miR-221</i>	2.3645	CBM	<i>miR-181b</i>	-1.8102	CG
<i>miR-29a</i>	1.9905	CBM	<i>miR-17-5p</i>	-1.8183	CG
<i>let-7f</i>	1.1999	CBM	<i>miR-28</i>	-2.2433	CG
<i>miR-223</i>	1.0596	CBM	<i>miR-15b</i>	-4.6788	CG

En el análisis de GSEA, LZMG y las células de memoria mostraron enriquecimiento común de rutas y genes relacionados con la zona marginal normal (IL-2, IL-6, TNF y CD40), mientras que LF y las células CG presentaron sobreexpresión de genes relacionados con el centro germinal (Figura 13).



DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El diagnóstico de LZMG frente a otros linfomas B de bajo grado sigue presentando actualmente dificultades debido a la ausencia de marcadores específicos. Este trabajo analiza los perfiles de expresión génica y de miRNAs y estudia las variaciones en el número de copias de DNA en una serie de casos seleccionados utilizando criterios de diagnóstico muy conservadores que excluyen aquellos casos con características intermedias o con datos clínicos insuficientes. Por ello, el tamaño de la serie se vió reducido pero a su vez se mejoró la potencia del análisis para la identificación de marcadores específicos de LZMG.

Los perfiles de expresión génica y de miRNAs fueron muy similares a lo largo de toda la serie de muestras LZMG, lo que garantiza la homogeneidad de los datos y sugiere que LZMG es una entidad única. El perfil transcripcional obtenido en el presente trabajo identifica las rutas metabólicas más relevantes en LZMG; propone nuevos marcadores específicos de LZMG, tanto genes como miRNAs; y sugiere posibles dianas terapéuticas.

Caracterización molecular del LZMG

El patrón de expresión identificado contiene rutas, genes y miRNAs relacionados con la ZMn y con células B de memoria, la subpoblación celular mayoritaria en la ZMn (Weill, Weller et al. 2009). Estos resultados apoyan que LZMG es la contrapartida tumoral de las células de la ZMn, lo que corrobora observaciones anteriores basadas en análisis morfológicos de LZM y sugiere que los casos típicos de LZM pueden ser más homogéneos de lo que en un principio se pensaba. Los genes y los miRNAs más relevantes sobreexpresados en LZMG, incluyendo los genes *TACI*, *CD44*, miembros del *cluster let-7*, *miR-221*, *miR-29c* y *miR-223* se encontraron también sobreexpresados al comparar las CBM frente a las células CG. Estos genes y miRNAs han sido además previamente descritos con elevada expresión en células B de memoria (Shen et al. 2004, Basso et al. 2009, Zhang et al. 2009, Jima et al. 2010). También en el análisis de rutas por GSEA, genes relacionados con células B de memoria aparecieron enriquecidos en LZMG frente a la expresión más alta de genes de CG encontrada en los casos de LF. Por tanto, los

perfiles de expresión génica y de miRNAs de LZMG reproducen los hallazgos obtenidos para las células B de memoria, lo que sería consistente con los datos que sugieren que las células B de memoria podrían ser el origen celular de este tumor (Weill et al. 2009). Asimismo, los datos obtenidos en este trabajo sugieren que el patrón de expresión de miRNAs en LZMG está íntimamente relacionado con el de expresión génica. Así, la sobreexpresión de *miR-221*, regulador de los marcadores de CG, *LMO2* y *CD10*, puede ser parcialmente responsable de la expresión de la firma molecular característica de la zona marginal. Los factores de transcripción *RELA* (subunidad *p65* de *NF-κB*) y *JUN*, ambos sobreexpresados en LZMG, cooperan funcionalmente con *miR-221* para inducir transcripción en tumores sólidos, revelando actividad oncogénica de este microRNA (Galardi et al. 2011). De esta manera, la sobreexpresión de *miR-221*, en cooperación con *JUN* y *RELA*, podría contribuir a la activación de la vía canónica de NF-κB, y por tanto a la supervivencia de las células tumorales. La deregulación de *miR-29c* ha sido descrita en linfomas B de bajo grado como LLC (Stamatopoulos et al. 2009) y el *cluster miR-29* se ha revelado como modulador de la respuesta inmune adaptativa (Liston et al. 2012). Además de *miR-29c*, otro miembro de esta familia de miRNAs (*miR-29a*) se encontró con sobreexpresión en CBM de nuestra serie, lo que parece relacionar esta familia de miRNAs con la firma molecular de la zona marginal normal.

El perfil de expresión génica descrito hasta el momento en los distintos subtipos de LZM sugiere que la estimulación antigénica crónica, potencialmente originada por organismos patógenos o por enfermedades autoinmunes, tiene un papel clave en la ontogenia de estos tumores (Ruiz-Ballesteros et al. 2005, Herreros et al. 2008, Huynh et al. 2008, Chng et al. 2009). La selección de células neoplásicas como consecuencia de estimulación antigénica crónica ha sido funcionalmente demostrada en LZMs, tanto en LZM-MALT (Wotherspoon et al. 1991, Roggero et al. 2000) como en LEZM (Szynglarewicz et al. 2007, Zibellini et al. 2010). La implicación de esta estimulación antigénica en la tumorigénesis de los LZMs se ha puesto de manifiesto con la reducción significativa del tumor inherente a la erradicación de la infección (Park et al. 2012) o al control del desorden autoinmune asociados (Pinnix et al. 2012). En este modelo de tumorigénesis, la infección de *Helicobacter pylori* en el LZM-MALT sin alteraciones cromosómicas asociadas supone un paradigma ampliamente estudiado en otros linfomas (Suarez et al. 2006, Du 2011). En nuestros resultados, la sobreexpresión de genes funcionalmente relacionados con procesos de presentación de antígeno, como *HLAs* de clase I y II, y otros genes relacionados estructuralmente, como *CD81* y *CD74*, sugiere un papel importante de la respuesta inmune en este linfoma. *CD74* ha sido directamente involucrado en la

maduración del linfocito B a través de la señalización de NF- κ B (Starlets et al. 2006) y es crítico para la presentación antigénica por parte del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CMH II). Además, *CD74* ha sido propuesta como candidato a diana terapéutica en neoplasias de célula B (Stein et al. 2007). Sin embargo en LZMG, el origen de esta estimulación antigénica no siempre está claro, pues a pesar de que se ha descrito la asociación entre este linfoma y el VHC (Marasca et al. 2001), hasta el momento no se ha determinado si esta asociación es clave en la patogenia de LZMG. El reducido número de casos con VHC+ en nuestra serie (2 pacientes) no permite ninguna conclusión relevante al respecto, aunque la sobreexpresión de receptores de superficie y genes funcionalmente relacionados con los mecanismos de presentación de antígeno, sugieren que la estimulación antigénica puede finalmente ser un fenómeno esencial en la patogénesis de esta neoplasia. Cabe destacar que *CD81*, que ha sido descrito como receptor de VHC (Cocquerel et al. 2003), apareció sobreexpresado en los dos casos VHC+. Por tanto, la causa primera de esta estimulación antigénica crónica no ha sido establecida en LZMG. A este respecto, un estudio amplio de la diversidad de epítomos que estimulan al receptor de célula B postula la posible existencia de un superantígeno desconocido y común que podría contribuir en la estimulación antigénica de diversos linfomas B de bajo grado entre los que se cuentan los LZM (Zibellini et al. 2010).

El microambiente inflamatorio, compuesto por citoquinas proinflamatorias y células acompañantes, incluyendo células presentadoras de antígeno y células T, parece ser crucial en los distintos tipos de linfoma. En LZMG, se observó sobreexpresión de genes relacionados con estas células acompañantes como *CHIT1*, *CHI1L3* (macrófagos), *TFEB*, *TCF4* y *VAV1* (células T) y enriquecimiento de rutas metabólicas activadas por citoquinas (interleuquinas y TNF), lo que pone de manifiesto el papel relevante de estos subtipos celulares en el contexto inflamatorio de este desorden, de forma similar a los hallazgos publicados en LZM-MALT (Bende et al. 2009). Situaciones inflamatorias crónicas suponen a su vez una estimulación antigénica crónica, la cual podría contribuir en eventos esenciales en la patogenia del LZMG como la estimulación de NF- κ B. Las citoquinas proinflamatorias activarían por tanto rutas de supervivencia en célula B que a su vez inducirían la transcripción génica por la entrada de NF- κ B en el núcleo, lo que se corresponde con los resultados obtenidos en el análisis de enriquecimiento por GSEA, donde aparecieron sobreexpresadas las rutas de señalización de BCR, TNFR, IL2, IL6, CD40 y la subunidad de NF- κ B, RELA (p65). Otras vías de comunicación celular y señalización de citoquinas aparecieron sobreexpresadas en la firma molecular de LZMG, como integrinas, IFN γ y CD70 (CD27L). Por consiguiente, las citoquinas inflamatorias

presentes en este contexto inmunológico podrían contribuir a la aparición y a la progresión del linfoma, o al menos podrían estar involucradas en la supervivencia de las células tumorales. Además, los datos obtenidos en este estudio identifican la sobreexpresión de la ruta de señalización de BCR como esencial para la supervivencia de las células de LZMG. De este modo, *SYK*, *LYN*, *BLK* y *BLNK*, tirosín-quinasas implicadas en la señalización de BCR, aparecieron sobreexpresadas en LZMG, y han sido descritas también con elevados niveles de expresión en otros LZM (Ruiz-Ballesteros et al. 2005, Huynh et al. 2008). Los miRNAs sobreexpresados de la firma, *miR-221*, *miR-555* y *miR-29c*, mostraron de forma significativa correlación positiva (correlación de *Pearson*) con las rutas enriquecidas en el análisis de expresión génica (GSEA): BCR, IL2, IL6, CD40, RELA, TGFB y células B de memoria; lo que parece sugerir la implicación de estos miRNAs en la regulación de estas rutas y revela un papel muy significativo de estas rutas en LZMG. Por último, la contribución de algunas de estas rutas en el microambiente inflamatorio, como IL2, IL6, TGFB y CD40, podría indicar la implicación de estos miRNAs sobreexpresados en los eventos inflamatorios descritos anteriormente. Un estudio pormenorizado de este microambiente inflamatorio puede ser especialmente interesante en aquellos casos donde no puede evidenciarse infección crónica o enfermedad autoinmune asociados. Además, el estudio del contexto inflamatorio ha permitido abrir nuevas vías de investigación en el desarrollo de terapias que puedan hacer frente a la estimulación antigénica crónica inherente a los linfomas B de bajo grado (Aldinucci et al. 2010).

El análisis de rutas realizado mediante GSEA reveló también la sobreexpresión de la ruta de señalización de TGFB, implicada en muy diversas funciones en células hematopoyéticas en función de la subpoblación celular, influyendo en el balance entre diferenciación y proliferación (Kim and Letterio 2003). La sobreexpresión de la ruta de señalización de TGFB podría interpretarse como otro indicador del papel que las subpoblaciones celulares acompañantes pueden jugar en la patogénesis de LZMG (Wrzesinski et al. 2007). *TGFB1*, *Transforming growth factor beta-1*, apareció sobreexpresado en LZMG, pertenece a la superfamilia de TGF y como sucedía con su ruta de señalización, es crucial en la regulación del balance proliferación-diferenciación en células hematopoyéticas (Kim and Letterio 2003). Sin embargo, igualmente en células hematopoyéticas se le han descrito funciones opuestas a este gen dependiendo del contexto, desde inhibidor del crecimiento celular hasta activador de la progresión tumoral (Wrzesinski et al. 2007). Por último, otras rutas relacionadas con señales de supervivencia, como MAPKs, se encontraron enriquecidas en LZMG frente a GLR, por lo que podrían contribuir también a la supervivencia de las células tumorales del linfoma.

En la firma molecular de LZMG, se encontraron sobreexpresados un gran número de genes implicados en la vía de señalización de NF- κ B, como *TACI*, *CD74*, *CD81*, *CD82*, *PRKD2*, *RELA* y *TRAF4*, lo que confirma el papel preponderante de este factor de transcripción en la patogénesis de los linfomas B (Zarnegar et al. 2008, Kanellis et al. 2009). Paralelamente a la acción de estas moléculas, otras vías de señalización pueden estimular indirectamente a NF- κ B, tanto por la ruta canónica como por la alternativa, como BCR, interleuquinas, CD40, TACI y TNF. *TACI* (*TNFRSF13B*), *transmembrane activator and CAML interactor*, es un miembro de la familia de receptores de TNF implicados en la respuesta inmune TI-2 para la correcta diferenciación de las células de la zona marginal a células plasmáticas (Mantchev et al. 2007). Este gen tiene múltiples funciones en el linfocito B, como regulador de la apoptosis y activador de NF- κ B, tanto por la vía clásica como por la no canónica, a través del reclutamiento de *TRAF2*, *TRAF5* y *TRAF6* (He et al. 2004). Por tanto, *TACI* puede ser un gen crucial en el mecanismo molecular e LZMG y podría ser un nuevo candidato a diana terapéutica.

Aunque las deleciones cromosómicas en la banda 6q21-25, que afectan al regulador negativo de NF- κ B, *TNFAIP3* (*A20*), han sido descritas en LZM en varios trabajos publicados previamente (Honma et al. 2009, Kato et al. 2009, Novak et al. 2009), nuestros datos no confirman esta pérdida, ni en el análisis de número de copias ni en el patrón de expresión génica, lo que puede ser consecuencia del reducido tamaño de nuestra serie o de la relativa baja resolución del array utilizado en el ensayo de CNA. De forma similar, nuestros resultados tampoco confirman ni en los estudios de expresión génica ni en los de CNA, la traslocación recientemente descrita en un único caso de LZMG, t(11;14)(q23;q32) que supone la sobreexpresión de *DDX6*, resultando en la desregulación de *BCL6* de forma independiente a NF- κ B. Esta nueva alteración cromosómica parece ser un evento muy poco frecuente en LZM, pues en este trabajo previo se analizan más de 60 muestras con LZM encontrando un único caso positivo (Sary et al. 2013).

Diagnóstico diferencial frente a LF

Es interesante destacar que al comparar los perfiles de expresión génica y de miRNAs, tanto entre LZMG y LF, como entre las células CBM y CG; se encontraron genes, miRNAs y rutas metabólicas comunes, en LZMG y CBM por un lado, y en LF y CG por otro. En LZMG y CBM aparecieron sobreexpresados genes y miRNAs relacionados con la ZMn

como *CD44*, *TACI*, *IKZF3*, *miR-29c*, *miR-221*, *let-7f* y *miR-223* (Shen et al. 2004, Basso et al. 2009, Zhang et al. 2009, Jima et al. 2010); y en GSEA se observó enriquecimiento de genes relacionados con células B de memoria. Igualmente, en LF y CG se encontraron sobreexpresados genes y miRNAs relacionados con centro germinal como *CD10*, *BCL6*, *LMO2* y *miR-181b* (Shen et al. 2004, Basso et al. 2009, Zhang et al. 2009, Jima et al. 2010); y en GSEA apareció enriquecido el grupo funcional de genes de centro germinal. Estos resultados se corresponden con los hallazgos previos que sugieren que la ZMn supone la contrapartida no tumoral del LZMG y que sitúan el origen del LF en las células B de CG.

CD44 es una molécula de adhesión expresada en LZM y otros linfomas no Hodgkin y además es un miembro integral del complejo receptor de *CD74* (Shi et al. 2006, Chng et al. 2009). En una revisión reciente, la sobreexpresión de *CD44* se ha propuesto como nueva vía de investigación para el desarrollo de estrategias diagnósticas y terapéuticas en cáncer (Negi et al. 2012). Nuestros resultados revelan que la expresión de *CD44* fue significativamente más alta en LZMG que en LF, tanto a nivel de ARNm (microarrays) como a nivel proteico (IHQ), de forma que un conocimiento más detallado de esta molécula podría mejorar el diagnóstico del LZMG. Un estudio previo e independiente ya encontró expresión más alta de *TACI* en LZMG que en LF, por lo que nuestros datos confirman estos descubrimientos (Wada et al. 2009). Comparando frente al LF se observó también sobreexpresión de genes implicados en el desarrollo y en la diferenciación de linfocitos como *TGFB1*, genes relacionados con TNF (*MADD* y el mismo *TACI*), y marcadores de macrófagos como *CHIT1* y *CHIT3L1*. *TACI*, *CHIT1* y *TGFB1* mostraron expresión más alta en LZMG que en LF, en los datos de microarrays y en el ensayo de RT-PCR, por lo que podrían ser candidatos a nuevos marcadores con valor diagnóstico en este linfoma. Además de estos nuevos candidatos, la comparación frente al LF reveló genes descritos con valor diagnóstico frente a LF como *MNDA*, cuya expresión fue evaluada por nuestro grupo en un trabajo previo encontrando que fue significativamente más alta en LZMG que en LF (Kanellis et al. 2009). Los resultados obtenidos en el perfil de expresión de miRNAs sugieren que la expresión diferencial de *miR-221*, *miR-223*, *let-7f* y *miR-494* frente a LF podría asimismo tener aplicación en el diagnóstico de LZMG.

El análisis funcional en GSEA reveló también enriquecimiento en LZMG de vías de señalización implicadas en la respuesta inmune como IL10. Esta interleuquina regula la respuesta inmune adquirida y puede ser secretada por varias cohortes de células inflamatorias entre las que se cuentan los macrófagos y las células T (Kubo and Motomura 2012). De esta manera, la expresión incrementada de genes y rutas

relacionadas con macrófagos y células T, destaca el papel esencial de las subpoblaciones de células acompañantes en la zona marginal, tanto normal como tumoral (Malaguarnera et al. 2005).

Los casos con LF mostraron también fuerte expresión de genes relacionados con supervivencia de célula B como *LEF1* y *MYB2L1*. En un estudio reciente se analizó la expresión proteica de *LEF1* en linfomas B de bajo grado, encontrando expresión negativa en los 15 casos de LZMG analizados, mientras que fue positiva en la mitad de los casos de LF con estadios avanzados (Tandon et al. 2011), lo que se corresponde con nuestros resultados. Las células de CG, y paralelamente las muestras con LF, se distinguieron por un incremento en la expresión de *LMO2* y una disminución en la expresión de *miR-223*, mientras que las CBM y el LZMG mostraron sobreexpresión de *miR-223* y represión de *LMO2*. El control de la expresión de *LMO2* llevado a cabo por *miR-223* es esencial en la regulación del desarrollo de célula B (Zhang et al. 2009), por lo que la represión de *LMO2* y la elevada expresión de *miR-223* obtenidos en este estudio, sugieren que la asociación *miR-223/LMO2* podría tener un papel relevante en la morfogénesis de LZMG. Multitud de procesos moleculares, tales como ciclo celular, apoptosis o proliferación celular son regulados por el *cluster let-7*, debido a lo cual este *cluster* ha sido propuesto como firme candidato en el desarrollo de nuevas terapias en linfoma (Di Lisio et al. 2010). Concretamente *let-7f*, apareció sobreexpresado en un trabajo muy reciente en el que se relaciona el patrón de expresión de miRNAs con la respuesta a fármacos en LLC (Zhu et al. 2012). La ciclina D2 (*CCND2*) es diana putativa de *miR-494* y regula la transición de G1 a S en un control esencial para el adecuado equilibrio del ciclo celular (Huang et al. 2007). Adicionalmente a esta regulación, *miR-494*, que se encontró reprimido tanto en LZMG como en las células CBM, se ha visto que suprime la proliferación celular e induce quiescencia en líneas celulares tumorales (Ohdaira et al. 2012), por lo que este miRNA podría estar regulando procesos relacionados con la firma molecular de la zona marginal.

Diagnóstico diferencial frente a LEZM

La comparación entre las firmas moleculares de LZMG y LEZM encontró sobreexpresión de genes relacionados con células B de memoria y con señalización de BCR tanto en el subtipo esplénico como en LZMG, lo que se corresponde con el supuesto origen post-CG de los linfomas de la zona marginal. Este análisis identificó también un grupo de genes y miRNAs con expresión diferencial significativa. Resulta también interesante destacar que ganglios infiltrados por LEZM se agruparon con las muestras de

LEZM en el bazo en comparación con los casos de LZMG, lo que sugiere que el LZMG diseminado puede ser distinguible del LEZM (Figura 15). Por tanto, y aunque estos resultados requieren de una validación posterior en una serie más amplia, estos dos desórdenes parecen representar entidades separadas y no únicamente dos estados diferentes de la misma enfermedad. Entre los genes y miRNAs con expresión diferencial se encontraron moléculas relevantes en cáncer y pertenecientes a las respectivas firmas moleculares, tanto del LZMG (*JUN*, *TGFB1*, *PRKD2* y *miR-199a*, sobreexpresado en LZMG frente a LF); como del LEZM (*RHOH*, *AIM2*, *miR-21* y *miR-155*) lo que sugiere que las firmas moleculares identificadas en este trabajo podrían tener valor diagnóstico. El *miR-199a*, implicado en la regulación de la expresión de diversos oncogenes en tumores sólidos (Iorio et al. 2007), apareció sobreexpresado en LZMG al compararlo tanto frente a LF como a LEZM, por lo que sería interesante un estudio más pormenorizado de este microRNA en LZMG.

La relevancia de los macrófagos/monocitos en el microambiente de LZMG podría estar vinculada con la sobreexpresión de genes inducidos por la citoquina *TNF* (Chang et al. 2012), como los genes *JUN* o *LMNA*, ambos sobreexpresados en LZMG. Por su parte, en LEZM el análisis de GSEA mostró enriquecimiento en la señalización de caspasas, incluyendo la caspasa 3 (*CASP3*) lo que se corresponde con los hallazgos previos que asocian las células de la zona marginal esplénica con la activación de esta caspasa en ratones (Kishi and Tsubata. 2009).

Por último, el reducido tamaño de la serie de ganglios infiltrados por LZM-MALT, únicamente 4 casos, no permite sugerir ninguna conclusión al respecto, por lo que el diagnóstico diferencial entre LZMG y LZM-MALT no se ha podido abordar convenientemente en este estudio.

El presente trabajo identifica genes con expresión diferencial en LZMG, tanto frente al ganglio reactivo, como frente a LF y frente a LEZM: *CD82*, *PRKD2*, *IRF3*, *PIK4CB*, *TGFB1*, *IKIP* y *RAD54B*; por lo que estos genes podrían representar nuevos candidatos potenciales a marcadores específicos del LZMG y a genes con valor diagnóstico en linfomas B de bajo grado. Adicionalmente, dada la gran relevancia de estos genes en la regulación de NF-κB y en la respuesta inmune, estas moléculas podrían estar implicadas en la tumorigénesis del LZMG.

A pesar de la asociación de la activación constitutiva de NF-κB con alteraciones cromosómicas, como la del(6q23), o con microorganismos patógenos (VHC), la

patogénesis del LZMG no ha sido convenientemente clarificada hasta la fecha. En este linfoma encontramos porcentajes muy relevantes de pacientes con ausencia tanto de alteraciones moleculares descritas (alrededor del 50%) como de desencadenantes antigénicos conocidos (al menos un 75%). La firma molecular del LZMG identificada en este estudio contiene genes funcionalmente relacionados con procesos de presentación de antígeno, genes y rutas implicadas en el microambiente inflamatorio y rutas involucradas en la supervivencia de célula B. Por tanto, en su conjunto, esta firma molecular sugiere un papel crucial del microambiente inflamatorio en la linfomagénesis del LZMG. De este modo, las citoquinas proinflamatorias, secretadas tanto por las células acompañantes (células T y macrófagos) como por las propias células B activadas (proceso de estimulación autoantigénica), podrían excitar a las células B tumorales, causando estimulación antigénica crónica de forma similar a los desórdenes autoinmunes o a la presencia de microorganismos patógenos conocidos, como el VHC, o algún otro aún no identificado. La estimulación crónica de las células tumorales podría activar receptores de superficie que desencadenen rutas de proliferación que en última instancia activarían a NF- κ B, tanto por la vía canónica como por la ruta alternativa, y en definitiva inducir incremento en la supervivencia de la célula tumoral (Figura 18). No obstante, este es un modelo que requiere estudios funcionales complementarios confirmatorios.

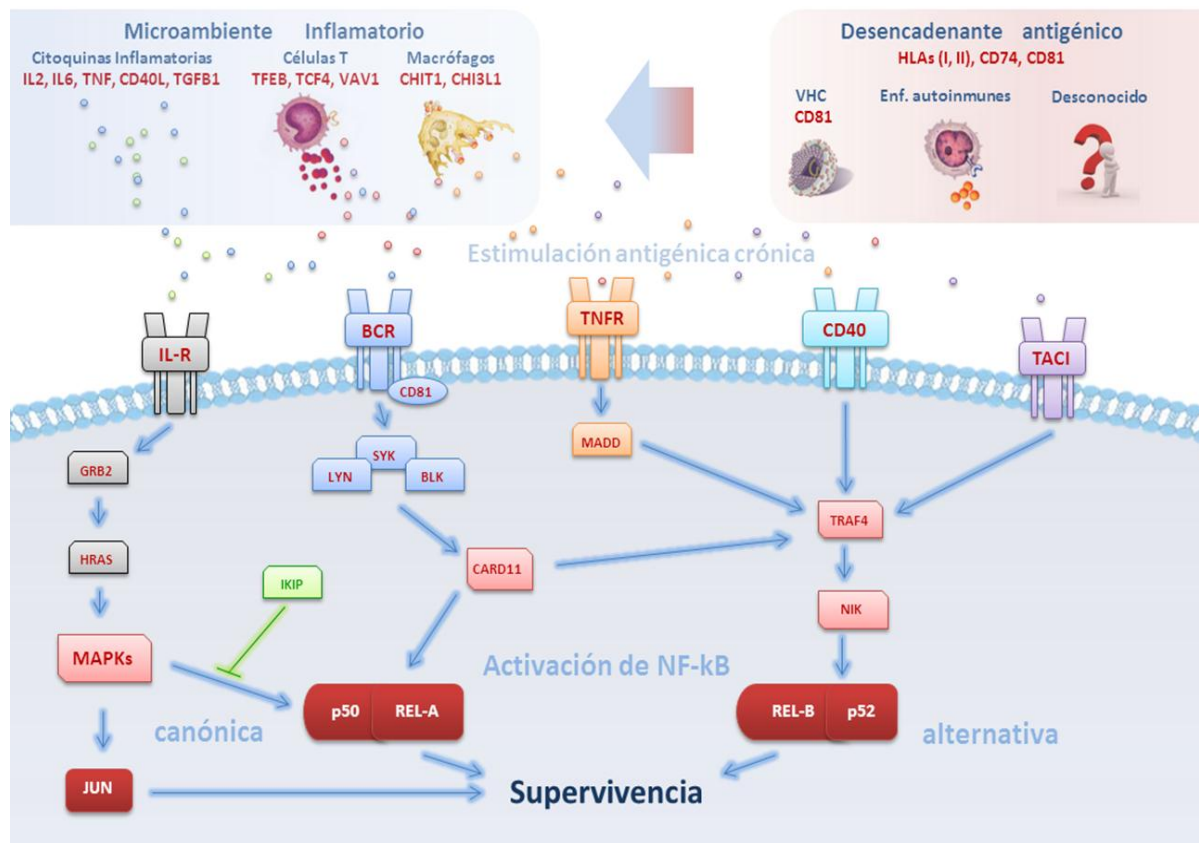


Figura 18. Modelo representativo de la hipótesis de activación de NF-kB en LZMG. En rojo aparecen los genes y rutas sobreexpresados y en verde los reprimidos. Las flechas azules representan estimulación y las líneas verdes inhibición.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El linfoma de la zona marginal ganglionar supone una entidad molecular única y claramente diferenciada de los otros subtipos de linfoma de la zona marginal y de los demás linfomas B de bajo grado, según establece su perfil molecular homogéneo.
2. El linfoma de la zona marginal ganglionar reproduce el patrón molecular de la zona marginal normal, expresando genes y miRNAs característicos de esta zona.
3. La sobreexpresión de citoquinas, genes proinflamatorios y genes relacionados con procesos de presentación de antígeno; unido al enriquecimiento de vías de señalización de interleuquinas e integrinas, sugieren que el microambiente inflamatorio y la estimulación antigénica podrían ser relevantes en este tipo de linfoma.
4. El perfil molecular del linfoma de la zona marginal ganglionar ha permitido la identificación de genes y miRNAs que forman parte de rutas metabólicas que podrían estar implicadas en la ontogenia de este desorden:
 - genes: *CD74*, *TACI*, *TGFB1*
 - miRNAs: *miR-221*
 - rutas: interleuquinas, integrinas, CD40, BCR, NF-kB y TGFB.
5. Se han identificado igualmente genes y miRNAs con expresión diferencial entre el linfoma de la zona marginal ganglionar y el linfoma folicular que podrían tener valor diagnóstico:
 - genes: *CD44*, *TACI*, *TGFB1*, *CHIT1*
 - miRNAs: *miR-221*, *miR-223*, *let-7f*
6. Han sido identificados genes y miRNAs con expresión diferencial entre el linfoma de la zona marginal ganglionar y el linfoma esplénico de la zona marginal, por lo que el estudio del perfil molecular podría ser útil en el diagnóstico de estos dos subtipos de linfoma:

- genes: *CD82*, *PRKD2*, *IRF3*, *PIK4CB*, *TGFB1*
- miRNAs: *miR-199a*
- rutas: IL2, IL6, integrinas, CD40, TNFR y TGFB

7. Algunos de los genes más relevantes de este trabajo se han revelado como nuevos candidatos potenciales a dianas terapéuticas como *CD74* o *TACI*.



REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Aldinucci, D., A. Gloghini, A. Pinto, R. De Filippi and A. Carbone (2010). "The classical Hodgkin's lymphoma microenvironment and its role in promoting tumour growth and immune escape." *J Pathol* **221**(3): 248-263.
- Alizadeh, A. A., M. B. Eisen, R. E. Davis, C. Ma, I. S. Lossos, A. Rosenwald, J. C. Boldrick, H. Sabet, T. Tran, X. Yu, J. I. Powell, L. Yang, G. E. Marti, T. Moore, J. Hudson, L. Lu, D. B. Lewis, R. Tibshirani, G. Sherlock, W. C. Chan, T. C. Greiner, D. D. Weisenburger, J. O. Armitage, R. Warnke, R. Levy, W. Wilson, M. R. Grever, J. C. Byrd, D. Botstein, P. O. Brown and L. M. Staudt (2000). "Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling." *Nature* **403**(6769): 503-511.
- Arcaini, L., S. Burcheri, A. Rossi, M. Paulli, R. Bruno, F. Passamonti, E. Brusamolino, A. Molteni, A. Pulsoni, M. C. Cox, L. Orsucci, A. Fabbri, M. Frezzato, M. T. Voso, F. Zaja, F. Montanari, M. Merli, C. Pascutto, E. Morra, S. Cortelazzo and M. Lazzarino (2007). "Prevalence of HCV infection in nongastric marginal zone B-cell lymphoma of MALT." *Ann Oncol* **18**(2): 346-350.
- Arcaini, L., M. Lucioni, E. Boveri and M. Paulli (2009). "Nodal marginal zone lymphoma: current knowledge and future directions of an heterogeneous disease." *Eur J Haematol* **83**(3): 165-174.
- Arcaini, L., M. Paulli, S. Burcheri, A. Rossi, M. Spina, F. Passamonti, M. Lucioni, T. Motta, V. Canzonieri, M. Montanari, E. Bonoldi, A. Gallamini, L. Uziel, M. Crugnola, A. Ramponi, F. Montanari, C. Pascutto, E. Morra, M. Lazzarino and I. I. Linfomi (2007). "Primary nodal marginal zone B-cell lymphoma: clinical features and prognostic assessment of a rare disease." *Br J Haematol* **136**(2): 301-304.
- Barh, D., R. Malhotra, B. Ravi and P. Sindhurani (2010). "MicroRNA let-7: an emerging next-generation cancer therapeutic." *Curr Oncol* **17**(1): 70-80.
- Basso, K., P. Sumazin, P. Morozov, C. Schneider, R. L. Maute, Y. Kitagawa, J. Mandelbaum, J. Haddad, C. Z. Chen, A. Califano and R. Dalla-Favera (2009). "Identification of the human mature B cell miRNome." *Immunity* **30**(5): 744-752.
- Bellefroid, E. J., J. C. Marine, T. Ried, P. J. Lecocq, M. Rivière, C. Amemiya, D. A. Poncelet, P. G. Coulie, P. de Jong and C. Szpirer (1993). "Clustered organization of homologous KRAB zinc-finger genes with enhanced expression in human T lymphoid cells." *EMBO J* **12**(4): 1363-1374.
- Bende, R. J., F. van Maldegem and C. J. van Noesel (2009). "Chronic inflammatory disease, lymphoid tissue neogenesis and extranodal marginal zone B-cell lymphomas." *Haematologica* **94**(8): 1109-1123.
- Bouteloup, M., A. Verney, N. Rachinel, E. Callet-Bauchu, M. Ffrench, B. Coiffier, J. P. Magaud, F. Berger, G. A. Salles and A. Traverse-Glehen (2012). "MicroRNA expression profile in splenic marginal zone lymphoma." *Br J Haematol* **156**(2): 279-281.
- Burstein, E., J. E. Hoberg, A. S. Wilkinson, J. M. Rumble, R. A. Csomos, C. M. Komarck, G. N. Maine, J. C. Wilkinson, M. W. Mayo and C. S. Duckett (2005). "COMMD proteins, a novel family of structural and functional homologs of MURR1." *J Biol Chem* **280**(23): 22222-22232.
- Cai, X., C. H. Hagedorn and B. R. Cullen (2004). "Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs." *RNA* **10**(12): 1957-1966.

Calin, G. A., M. Ferracin, A. Cimmino, G. Di Leva, M. Shimizu, S. E. Wojcik, M. V. Iorio, R. Visone, N. I. Sever, M. Fabbri, R. Iuliano, T. Palumbo, F. Pichiorri, C. Roldo, R. Garzon, C. Sevignani, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C. G. Liu, T. J. Kipps, M. Negrini and C. M. Croce (2005). "A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia." *N Engl J Med* **353**(17): 1793-1801.

Camacho, F. I., P. Algara, M. Mollejo, J. F. García, C. Montalbán, N. Martínez, M. Sánchez-Beato and M. A. Piris (2003). "Nodal marginal zone lymphoma: a heterogeneous tumor: a comprehensive analysis of a series of 27 cases." *Am J Surg Pathol* **27**(6): 762-771.

Camacho, F. I., J. F. García, L. Sánchez-Verde, A. I. Sáez, M. Sánchez-Beato, M. Mollejo and M. A. Piris (2001). "Unique phenotypic profile of monocytoid B cells: differences in comparison with the phenotypic profile observed in marginal zone B cells and so-called monocytoid B cell lymphoma." *Am J Pathol* **158**(4): 1363-1369.

Campo, E., R. Miquel, L. Krenacs, L. Sorbara, M. Raffeld and E. S. Jaffe (1999). "Primary nodal marginal zone lymphomas of splenic and MALT type." *Am J Surg Pathol* **23**(1): 59-68.

Chang, M. Y., C. K. Chan, K. R. Braun, P. S. Green, K. D. O'Brien, A. Chait, A. J. Day and T. N. Wight (2012). "Monocyte-to-macrophage differentiation: synthesis and secretion of a complex extracellular matrix." *J Biol Chem* **287**(17): 14122-14135.

Chen, C. Z., L. Li, H. F. Lodish and D. P. Bartel (2004). "MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation." *Science* **303**(5654): 83-86.

Chen, R. W., L. T. Bemis, C. M. Amato, H. Myint, H. Tran, D. K. Birks, S. G. Eckhardt and W. A. Robinson (2008). "Truncation in CCND1 mRNA alters miR-16-1 regulation in mantle cell lymphoma." *Blood* **112**(3): 822-829.

Chng, W. J., E. D. Remstein, R. Fonseca, P. L. Bergsagel, J. A. Vrana, P. J. Kurtin and A. Dogan (2009). "Gene expression profiling of pulmonary mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma identifies new biologic insights with potential diagnostic and therapeutic applications." *Blood* **113**(3): 635-645.

Christie, L., N. Kernohan, D. Levison, M. Sales, J. Cunningham, K. Gillespie, P. Batstone, D. Meiklejohn and J. Goodlad (2008). "C-MYC translocation in t(14;18) positive follicular lymphoma at presentation: An adverse prognostic indicator?" *Leuk Lymphoma* **49**(3): 470-476.

Cimmino, A., G. A. Calin, M. Fabbri, M. V. Iorio, M. Ferracin, M. Shimizu, S. E. Wojcik, R. I. Aqeilan, S. Zupo, M. Dono, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C. G. Liu, T. J. Kipps, M. Negrini and C. M. Croce (2005). "miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(39): 13944-13949.

Cocquerel, L., C. Kuo, J. Dubuisson and S. Levy (2003). "CD81-dependent binding of hepatitis C virus E1E2 heterodimers." *J Virol* **77**(19): 10677-10683.

Conconi, A., F. Bertoni, E. Pedrinis, T. Motta, E. Roggero, S. Luminari, C. Capella, M. Bonato, F. Cavalli and E. Zucca (2001). "Nodal marginal zone B-cell lymphomas may arise from different subsets of marginal zone B lymphocytes." *Blood* **98**(3): 781-786.

Cousar, J. B., D. L. McGinn, A. D. Glick, A. F. List and R. D. Collins (1987). "Report of an unusual lymphoma arising from parafollicular B-lymphocytes (PBLs) or so-called "monocytoid" lymphocytes." *Am J Clin Pathol* **87**(1): 121-128.

- Davids, M. S. and J. R. Brown (2012). "Targeting the B Cell Receptor Pathway in Chronic Lymphocytic Leukemia." *Leuk Lymphoma* **53**(12):2362-70.
- de Leval, L., N. L. Harris, J. Longtine, J. A. Ferry and L. M. Duncan (2001). "Cutaneous b-cell lymphomas of follicular and marginal zone types: use of Bcl-6, CD10, Bcl-2, and CD21 in differential diagnosis and classification." *Am J Surg Pathol* **25**(6): 732-741.
- Di Lisio, L., G. Gómez-López, M. Sánchez-Beato, C. Gómez-Abad, M. E. Rodríguez, R. Villuendas, B. I. Ferreira, A. Carro, D. Rico, M. Mollejo, M. A. Martínez, J. Menárguez, A. Díaz-Alderete, J. Gil, J. C. Cigudosa, D. G. Pisano, M. A. Piris and N. Martínez (2010). "Mantle cell lymphoma: transcriptional regulation by microRNAs." *Leukemia* **24**(7): 1335-1342.
- Doench, J. G. and P. A. Sharp (2004). "Specificity of microRNA target selection in translational repression." *Genes Dev* **18**(5): 504-511.
- Du, M. Q. (2011). "MALT lymphoma: many roads lead to nuclear factor-kb activation." *Histopathology* **58**(1): 26-38.
- Du, M. Q., H. Z. Peng, A. Dogan, T. C. Diss, H. Liu, L. X. Pan, R. P. Moseley, M. J. Briskin, J. K. Chan and P. G. Isaacson (1997). "Preferential dissemination of B-cell gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma to the splenic marginal zone." *Blood* **90**(10): 4071-4077.
- Duggan, D. J., M. Bittner, Y. Chen, P. Meltzer and J. M. Trent (1999). "Expression profiling using cDNA microarrays." *Nat Genet* **21**(1 Suppl): 10-14.
- Eis, P. S., W. Tam, L. Sun, A. Chadburn, Z. Li, M. F. Gomez, E. Lund and J. E. Dahlberg (2005). "Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(10): 3627-3632.
- Eisen, M. B., P. T. Spellman, P. O. Brown and D. Botstein (1998). "Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(25): 14863-14868.
- Falini, B., E. Tiacci, A. Pucciarini, B. Bigerna, J. Kurth, G. Hatzivassiliou, S. Droetto, B. V. Galletti, M. Gambacorta, A. Orazi, L. Pasqualucci, I. Miller, R. Kupperts, R. Dalla-Favera and G. Cattoretti (2003). "Expression of the IRTA1 receptor identifies intraepithelial and subepithelial marginal zone B cells of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)." *Blood* **102**(10): 3684-3692.
- Fernández, V., O. Salamero, B. Espinet, F. Solé, C. Royo, A. Navarro, F. Camacho, S. Beà, E. Hartmann, V. Amador, L. Hernández, C. Agostinelli, R. L. Sargent, M. Rozman, M. Aymerich, D. Colomer, N. Villamor, S. H. Swerdlow, S. A. Pileri, F. Bosch, M. A. Piris, E. Montserrat, G. Ott, A. Rosenwald, A. López-Guillermo, P. Jares, S. Serrano and E. Campo (2010). "Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma." *Cancer Res* **70**(4): 1408-1418.
- Ferreira, B. I., J. F. Garcia, J. Suela, M. Mollejo, F. I. Camacho, A. Carro, S. Montes, M. A. Piris and J. C. Cigudosa (2008). "Comparative genome profiling across subtypes of low-grade B-cell lymphoma identifies type-specific and common aberrations that target genes with a role in B-cell neoplasia." *Haematologica* **93**(5): 670-679.
- Galardi, S., N. Mercatelli, M. G. Farace and S. A. Ciafrè (2011). "NF- κ B and c-Jun induce the expression of the oncogenic miR-221 and miR-222 in prostate carcinoma and glioblastoma cells." *Nucleic Acids Res* **39**(9): 3892-3902.
- Garzon, R., S. Liu, M. Fabbri, Z. Liu, C. E. Heaphy, E. Callegari, S. Schwind, J. Pang, J. Yu, N. Muthusamy, V. Havelange, S. Volinia, W. Blum, L. J. Rush, D. Perrotti, M. Andreeff, C. D.

- Bloomfield, J. C. Byrd, K. Chan, L. C. Wu, C. M. Croce and G. Marcucci (2009). "MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1." *Blood* **113**(25): 6411-6418.
- Garzon, R., F. Pichiorri, T. Palumbo, M. Visentini, R. Aqeilan, A. Cimmino, H. Wang, H. Sun, S. Volinia, H. Alder, G. A. Calin, C. G. Liu, M. Andreeff and C. M. Croce (2007). "MicroRNA gene expression during retinoic acid-induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia." *Oncogene* **26**(28): 4148-4157.
- Georgantas, R. W., R. Hildreth, S. Morisot, J. Alder, C. G. Liu, S. Heimfeld, G. A. Calin, C. M. Croce and C. I. Civin (2007). "CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(8): 2750-2755.
- Glas, A. M., M. J. Kersten, L. J. Delahaye, A. T. Witteveen, R. E. Kibbelaar, A. Velds, L. F. Wessels, P. Joosten, R. M. Kerkhoven, R. Bernards, J. H. van Krieken, P. M. Kluin, L. J. van't Veer and D. de Jong (2005). "Gene expression profiling in follicular lymphoma to assess clinical aggressiveness and to guide the choice of treatment." *Blood* **105**(1): 301-307.
- Golub, T. R., D. K. Slonim, P. Tamayo, C. Huard, M. Gaasenbeek, J. P. Mesirov, H. Coller, M. L. Loh, J. R. Downing, M. A. Caligiuri, C. D. Bloomfield and E. S. Lander (1999). "Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring." *Science* **286**(5439): 531-537.
- Gottwein, E., N. Mukherjee, C. Sachse, C. Frenzel, W. H. Majoros, J. T. Chi, R. Braich, M. Manoharan, J. Soutschek, U. Ohler and B. R. Cullen (2007). "A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155." *Nature* **450**(7172): 1096-1099.
- Guinamard, R., M. Okigaki, J. Schlessinger and J. V. Ravetch (2000). "Absence of marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response." *Nat Immunol* **1**(1): 31-36.
- Harris, N., E. Jaffe, H. Stein, P. Banks, J. Chan, M. Cleary, G. Delsol, C. De Wolf-Peeters, B. Falini and K. Gatter (1994). "A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group." *Blood* **84**(5): 1361-1392.
- Harris, N. L., E. S. Jaffe, J. Diebold, G. Flandrin, H. K. Muller-Hermelink, J. Vardiman, T. A. Lister and C. D. Bloomfield (1999). "The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997." *Ann Oncol* **10**(12): 1419-1432.
- He, B., A. Chadburn, E. Jou, E. J. Schattner, D. M. Knowles and A. Cerutti (2004). "Lymphoma B cells evade apoptosis through the TNF family members BAFF/BLyS and APRIL." *J Immunol* **172**(5): 3268-3279.
- He, L., J. M. Thomson, M. T. Hemann, E. Hernando-Monge, D. Mu, S. Goodson, S. Powers, C. Cordon-Cardo, S. W. Lowe, G. J. Hannon and S. M. Hammond (2005). "A microRNA polycistron as a potential human oncogene." *Nature* **435**(7043): 828-833.
- Herreros, B., A. Sanchez-Aguilera and M. Piris (2008). "Lymphoma microenvironment: culprit or innocent?" *Leukemia* **22**(1): 49-58.

- Honma, K., S. Tsuzuki, M. Nakagawa, H. Tagawa, S. Nakamura, Y. Morishima and M. Seto (2009). "TNFAIP3/A20 functions as a novel tumor suppressor gene in several subtypes of non-Hodgkin lymphomas." *Blood* **114**(12): 2467-2475.
- Huang, W., H. Y. Chang, T. Fei, H. Wu and Y. G. Chen (2007). "GSK3 beta mediates suppression of cyclin D2 expression by tumor suppressor PTEN." *Oncogene* **26**(17): 2471-2482.
- Husson, H., E. G. Carideo, D. Neuberg, J. Schultze, O. Munoz, P. W. Marks, J. W. Donovan, A. C. Chillemi, P. O'Connell and A. S. Freedman (2002). "Gene expression profiling of follicular lymphoma and normal germinal center B cells using cDNA arrays." *Blood* **99**(1): 282-289.
- Huynh, M. Q., H. H. Wacker, T. Wundisch, K. Sohlbach, T. Daniel Kim, M. Krause, K. Stabla, P. Roth, W. Fischbach, M. Stolte and A. Neubauer (2008). "Expression profiling reveals specific gene expression signatures in gastric MALT lymphomas." *Leuk Lymphoma* **49**(5): 974-983.
- Iorio, M. V., R. Visone, G. Di Leva, V. Donati, F. Petrocca, P. Casalini, C. Taccioli, S. Volinia, C. G. Liu, H. Alder, G. A. Calin, S. Ménard and C. M. Croce (2007). "MicroRNA signatures in human ovarian cancer." *Cancer Res* **67**(18): 8699-8707.
- Jima, D. D., J. Zhang, C. Jacobs, K. L. Richards, C. H. Dunphy, W. W. Choi, W. Yan Au, G. Srivastava, M. B. Czader, D. A. Rizzieri, A. S. Lagoo, P. L. Lugar, K. P. Mann, C. R. Flowers, L. Bernal-Mizrachi, K. N. Naresh, A. M. Evens, L. I. Gordon, M. Luftig, D. R. Friedman, J. B. Weinberg, M. A. Thompson, J. I. Gill, Q. Liu, T. How, V. Grubor, Y. Gao, A. Patel, H. Wu, J. Zhu, G. C. Blobe, P. E. Lipsky, A. Chadburn, S. S. Dave and H. M. R. Consortium (2010). "Deep sequencing of the small RNA transcriptome of normal and malignant human B cells identifies hundreds of novel microRNAs." *Blood* **116**(23): e118-127.
- Kaminski, N. and N. Friedman (2002). "Practical approaches to analyzing results of microarray experiments." *Am J Respir Cell Mol Biol* **27**(2): 125-132.
- Kanellis, G., G. Roncador, A. Arribas, M. Mollejo, S. Montes-Moreno, L. Maestre, Y. Campos-Martin, J. Martinez-Torrecuadrada, L. Sanchez-Verde, R. Pajares, J. Cigudosa, M. Martin and M. Piris (2009). Identification of MNDA as a new marker for Nodal Marginal Zone Lymphoma, *Leukemia* **23**(10): 1847-57.
- Kanswal, S., N. Katsenelson, A. Selvapandiyan, R. J. Bram and M. Akkoyunlu (2008). "Deficient TACI expression on B lymphocytes of newborn mice leads to defective Ig secretion in response to BAFF or APRIL." *J Immunol* **181**(2): 976-990.
- Karin, M., Y. Cao, F. R. Greten and Z. W. Li (2002). "NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit." *Nat Rev Cancer* **2**(4): 301-310.
- Kato, M., M. Sanada, I. Kato, Y. Sato, J. Takita, K. Takeuchi, A. Niwa, Y. Chen, K. Nakazaki, J. Nomoto, Y. Asakura, S. Muto, A. Tamura, M. Iio, Y. Akatsuka, Y. Hayashi, H. Mori, T. Igarashi, M. Kurokawa, S. Chiba, S. Mori, Y. Ishikawa, K. Okamoto, K. Tobinai, H. Nakagama, T. Nakahata, T. Yoshino, Y. Kobayashi and S. Ogawa (2009). "Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas." *Nature* **459**(7247): 712-716.
- Kayagaki, N., Q. Phung, S. Chan, R. Chaudhari, C. Quan, K. M. O'Rourke, M. Eby, E. Pietras, G. Cheng, J. F. Bazan, Z. Zhang, D. Arnott and V. M. Dixit (2007). "DUBA: a deubiquitinase that regulates type I interferon production." *Science* **318**(5856): 1628-1632.
- Kim, S. and J. Letterio (2003). "Transforming growth factor-beta signaling in normal and malignant hematopoiesis." *Leukemia* **17**(9): 1731-1737.

- Kim, S. H., S. Y. Han, T. Azam, D. Y. Yoon and C. A. Dinarello (2005). "Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNF α ." *Immunity* **22**(1): 131-142.
- Kim, Y. K. and V. N. Kim (2007). "Processing of intronic microRNAs." *EMBO J* **26**(3): 775-783.
- Kishi, Y. and T. Tsubata (2009). "Apoptosis of marginal zone B-cells in unimmunized mice." *J Med Dent Sci* **56**(1): 49-54.
- Kluiver, J., S. Poppema, D. de Jong, T. Blokzijl, G. Harms, S. Jacobs, B. J. Kroesen and A. van den Berg (2005). "BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas." *J Pathol* **207**(2): 243-249.
- Kobayashi, T., M. Yamaguchi, S. Kim, J. Morikawa, S. Ogawa, S. Ueno, E. Suh, E. Dougherty, I. Shmulevich, H. Shiku and W. Zhang (2003). "Microarray reveals differences in both tumors and vascular specific gene expression in de novo CD5+ and CD5- diffuse large B-cell lymphomas." *Cancer Res* **63**(1): 60-66.
- Kubo, M. and Y. Motomura (2012). "Transcriptional regulation of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in acquired immune cells." *Front Immunol* **3**: 275.
- Lanasa, M. C., S. D. Allgood, A. D. Volkheimer, J. P. Gockerman, J. F. Whitesides, B. K. Goodman, J. O. Moore, J. B. Weinberg and M. C. Levesque (2010). "Single-cell analysis reveals oligoclonality among 'low-count' monoclonal B-cell lymphocytosis." *Leukemia* **24**(1): 133-140.
- Lawrie, C. H. (2007). "MicroRNA expression in lymphoma." *Expert Opin Biol Ther* **7**(9): 1363-1374.
- Lawrie, C. H. (2008). "MicroRNA expression in lymphoid malignancies: new hope for diagnosis and therapy?" *J Cell Mol Med* **12**(5A): 1432-1444.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum and V. Ambros (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." *Cell* **75**(5): 843-854.
- Lee, Y., C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Rådmark, S. Kim and V. N. Kim (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." *Nature* **425**(6956): 415-419.
- Lee, Y., K. Jeon, J. T. Lee, S. Kim and V. N. Kim (2002). "MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization." *EMBO J* **21**(17): 4663-4670.
- Li, Q. J., J. Chau, P. J. Ebert, G. Sylvester, H. Min, G. Liu, R. Braich, M. Manoharan, J. Soutschek, P. Skare, L. O. Klein, M. M. Davis and C. Z. Chen (2007). "miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection." *Cell* **129**(1): 147-161.
- Liston, A., A. S. Papadopoulou, D. Danso-Abeam and J. Dooley (2012). "MicroRNA-29 in the adaptive immune system: setting the threshold." *Cell Mol Life Sci* **69**(21): 3533-3541.
- Lossos, I. S. (2008). "Diffuse large B cell lymphoma: from gene expression profiling to prediction of outcome." *Biol Blood Marrow Transplant* **14**(1 Suppl 1): 108-111.
- Lund, E., S. Güttinger, A. Calado, J. E. Dahlberg and U. Kutay (2004). "Nuclear export of microRNA precursors." *Science* **303**(5654): 95-98.
- Malaguarnera, L., M. Musumeci, M. Di Rosa, A. Scuto and S. Musumeci (2005). "Interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide promote chitotriosidase gene expression in human macrophages." *J Clin Lab Anal* **19**(3): 128-132.

- Mantchev, G. T., C. S. Cortesao, M. Rebrovich, M. Cascalho and R. J. Bram (2007). "TACI is required for efficient plasma cell differentiation in response to T-independent type 2 antigens." *J Immunol* **179**(4): 2282-2288.
- Mantovani, A., P. Allavena, A. Sica and F. Balkwill (2008). "Cancer-related inflammation." *Nature* **454**(7203): 436-444.
- Marasca, R., P. Vaccari, M. Luppi, P. Zucchini, I. Castelli, P. Barozzi, A. Cuoghi and G. Torelli (2001). "Immunoglobulin gene mutations and frequent use of VH1-69 and VH4-34 segments in hepatitis C virus-positive and hepatitis C virus-negative nodal marginal zone B-cell lymphoma." *Am J Pathol* **159**(1): 253-261.
- Martínez, N., F. I. Camacho, P. Algara, A. Rodríguez, A. Dopazo, E. Ruíz-Ballesteros, P. Martín, J. A. Martínez-Climent, J. García-Conde, J. Menárguez, F. Solano, M. Mollejo and M. A. Piris (2003). "The molecular signature of mantle cell lymphoma reveals multiple signals favoring cell survival." *Cancer Res* **63**(23): 8226-8232.
- Mi, S., J. Lu, M. Sun, Z. Li, H. Zhang, M. B. Neilly, Y. Wang, Z. Qian, J. Jin, Y. Zhang, S. K. Bohlander, M. M. Le Beau, R. A. Larson, T. R. Golub, J. D. Rowley and J. Chen (2007). "MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(50): 19971-19976.
- Morschhauser, F., J. P. Leonard, L. Fayad, B. Coiffier, M. O. Petillon, M. Coleman, S. J. Schuster, M. J. Dyer, H. Horne, N. Teoh, W. A. Wegener and D. M. Goldenberg (2009). "Humanized anti-CD20 antibody, veltuzumab, in refractory/recurrent non-Hodgkin's lymphoma: phase I/II results." *J Clin Oncol* **27**(20): 3346-3353.
- Nathwani, B. N., J. R. Anderson, J. O. Armitage, F. Cavalli, J. Diebold, M. R. Drachenberg, N. L. Harris, K. A. MacLennan, H. K. Müller-Hermelink, F. A. Ullrich and D. D. Weisenburger (1999). "Marginal zone B-cell lymphoma: A clinical comparison of nodal and mucosa-associated lymphoid tissue types. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project." *J Clin Oncol* **17**(8): 2486-2492.
- Nathwani, B. N., J. R. Anderson, J. O. Armitage, F. Cavalli, J. Diebold, M. R. Drachenberg, N. L. Harris, K. A. MacLennan, H. K. Müller-Hermelink, F. A. Ullrich and D. D. Weisenburger (1999). "Marginal zone B-cell lymphoma: A clinical comparison of nodal and mucosa-associated lymphoid tissue types. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project." *J Clin Oncol* **17**(8): 2486-2492.
- Negi, L. M., S. Talegaonkar, M. Jaggi, F. J. Ahmad, Z. Iqbal and R. K. Khar (2012). "Role of CD44 in tumour progression and strategies for targeting." *J Drug Target* **20**(7): 561-573.
- Nieto, W. G., J. Almeida, A. Romero, C. Teodosio, A. López, A. F. Henriques, M. L. Sánchez, M. Jara-Acevedo, A. Rasillo, M. González, P. Fernández-Navarro, T. Vega, A. Orfao and P. H. C. G. o. S. f. t. S. o. MBL (2009). "Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach." *Blood* **114**(1): 33-37.
- Novak, U., A. Rinaldi, I. Kwee, S. Nandula, P. Rancoita, M. Compagno, M. Cerri, D. Rossi, V. Murty, E. Zucca, G. Gaidano, R. Dalla-Favera, L. Pasqualucci, G. Bhagat and F. Bertoni (2009). "The NF- κ B negative regulator TNFAIP3 (A20) is inactivated by somatic mutations and genomic deletions in marginal zone lymphomas." *Blood* **113**(20): 4918-4921.
- O'Connell, R. M., D. S. Rao, A. A. Chaudhuri and D. Baltimore (2010). "Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system." *Nat Rev Immunol* **10**(2): 111-122.

- O'Connor, O. A., J. Wright, C. Moskowitz, J. Muzzy, B. MacGregor-Cortelli, M. Stubblefield, D. Straus, C. Portlock, P. Hamlin, E. Choi, O. Dumetrescu, D. Esseltine, E. Trehu, J. Adams, D. Schenkein and A. D. Zelenetz (2005). "Phase II clinical experience with the novel proteasome inhibitor bortezomib in patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma and mantle cell lymphoma." *J Clin Oncol* **23**(4): 676-684.
- Ocio, E. M., J. M. Hernandez, G. Mateo, M. L. Sanchez, B. Gonzalez, B. Vidriales, N. C. Gutierrez, A. Orfao and J. F. San Miguel (2005). "Immunophenotypic and cytogenetic comparison of Waldenstrom's macroglobulinemia with splenic marginal zone lymphoma." *Clin Lymphoma* **5**(4): 241-245.
- Oh, S. Y., B. Y. Ryoo, W. S. Kim, K. Kim, J. Lee, H. J. Kim, J. M. Kwon, H. R. Lee, Y. H. Ko, S. J. Oh, K. W. Park, H. C. Kwon, E. Nam, J. H. Kim, Y. H. Park, S. S. Lee, H. Y. Kim and K. Park (2006). "Nodal marginal zone B-cell lymphoma: Analysis of 36 cases. Clinical presentation and treatment outcomes of nodal marginal zone B-cell lymphoma." *Ann Hematol* **85**(11): 781-786.
- Ohdaira, H., M. Sekiguchi, K. Miyata and K. Yoshida (2012). "MicroRNA-494 suppresses cell proliferation and induces senescence in A549 lung cancer cells." *Cell Prolif* **45**(1): 32-38.
- Oscier, D. G., A. C. Gardiner, S. J. Mould, S. Glide, Z. A. Davis, R. E. Ibbotson, M. M. Corcoran, R. M. Chapman, P. W. Thomas, J. A. Copplestone, J. A. Orchard and T. J. Hamblin (2002). "Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors." *Blood* **100**(4): 1177-1184.
- Park, S. K., H. Y. Jung, d. H. Kim, M. Y. Kim, J. H. Lee, K. S. Choi, K. D. Choi, H. J. Song, G. H. Lee and H. Kim (2012). "Regression of Advanced Gastric MALT Lymphoma after the Eradication of Helicobacter pylori." *Gut Liver* **6**(2): 270-274.
- Pauley, K. M., S. Cha and E. K. Chan (2009). "MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases." *J Autoimmun* **32**(3-4): 189-194.
- Pekarsky, Y., U. Santanam, A. Cimmino, A. Palamarchuk, A. Efanov, V. Maximov, S. Volinia, H. Alder, C. G. Liu, L. Rassenti, G. A. Calin, J. P. Hagan, T. Kipps and C. M. Croce (2006). "Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181." *Cancer Res* **66**(24): 11590-11593.
- Peveling-Oberhag, J., G. Crisman, A. Schmidt, C. Doring, M. Lucioni, L. Arcaini, S. Rattotti, S. Hartmann, A. Piiper, W. P. Hofmann, M. Paulli, R. Kuppers, S. Zeuzem and M. L. Hansmann (2012). "Dysregulation of global microRNA expression in splenic marginal zone lymphoma and influence of chronic hepatitis C virus infection." *Leukemia* **26**(7):1654-62.
- Pinnix, C. C., V. Reed and B. Dabaja (2012). "Gastric MALT lymphoma treated with primary radiotherapy in the setting of autoimmune disease." *J Natl Compr Canc Netw* **10**(7): 815-819.
- Piris, M. A., A. Arribas and M. Mollejo (2011). "Marginal zone lymphoma." *Semin Diagn Pathol* **28**(2): 135-145.
- Piris, M. A., M. Mollejo, E. Campo, J. Menárguez, T. Flores and P. G. Isaacson (1998). "A marginal zone pattern may be found in different varieties of non-Hodgkin's lymphoma: the morphology and immunohistology of splenic involvement by B-cell lymphomas simulating splenic marginal zone lymphoma." *Histopathology* **33**(3): 230-239.
- Piris, M. A., C. Rivas, M. Morente, M. A. Cruz, C. Rubio and H. Oliva (1988). "Monocytoid B-cell lymphoma, a tumour related to the marginal zone." *Histopathology* **12**(4): 383-392.

- Quackenbush, J. (2006). "Microarray analysis and tumor classification." *N Engl J Med* **354**(23): 2463-2472.
- Rinaldi, A., M. Mian, E. Chigrinova, L. Arcaini, G. Bhagat, U. Novak, P. M. Rancoita, C. P. De Campos, F. Forconi, R. D. Gascoyne, F. Facchetti, M. Ponzoni, S. Govi, A. J. Ferreri, M. Mollejo, M. A. Piris, L. Baldini, J. Soulier, C. Thieblemont, V. Canzonieri, V. Gattei, R. Marasca, S. Franceschetti, G. Gaidano, A. Tucci, S. Uccella, M. G. Tibiletti, S. Dirnhofer, C. Tripodo, C. Doglioni, R. Dalla Favera, F. Cavalli, E. Zucca, I. Kwee and F. Bertonni (2011). "Genome-wide DNA profiling of marginal zone lymphomas identifies subtype-specific lesions with an impact on the clinical outcome." *Blood* **117**(5): 1595-1604.
- Roccaro, A. M., A. Sacco, B. Thompson, X. Leleu, A. K. Azab, F. Azab, J. Runnels, X. Jia, H. T. Ngo, M. R. Melhem, C. P. Lin, D. Ribatti, B. J. Rollins, T. E. Witzig, K. C. Anderson and I. M. Ghobrial (2009). "MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma." *Blood* **113**(26): 6669-6680.
- Rodríguez, A., N. Martínez, F. I. Camacho, E. Ruíz-Ballesteros, P. Algara, J. F. García, J. Menárguez, T. Alvaro, M. F. Fresno, F. Solano, M. Mollejo, C. Martin and M. A. Piris (2004). "Variability in the degree of expression of phosphorylated IkappaBalpha in chronic lymphocytic leukemia cases with nodal involvement." *Clin Cancer Res* **10**(20): 6796-6806.
- Roggero, E., E. Zucca, C. Mainetti, F. Bertonni, C. Valsangiacomo, E. Pedrinis, B. Borisch, J. C. Piffaretti, F. Cavalli and P. G. Isaacson (2000). "Eradication of *Borrelia burgdorferi* infection in primary marginal zone B-cell lymphoma of the skin." *Hum Pathol* **31**(2): 263-268.
- Rosenwald, A., G. Wright, A. Wiestner, W. C. Chan, J. M. Connors, E. Campo, R. D. Gascoyne, T. M. Grogan, H. K. Muller-Hermelink, E. B. Smeland, M. Chiorazzi, J. M. Giltnane, E. M. Hurt, H. Zhao, L. Averett, S. Henrickson, L. Yang, J. Powell, W. H. Wilson, E. S. Jaffe, R. Simon, R. D. Klausner, E. Montserrat, F. Bosch, T. C. Greiner, D. D. Weisenburger, W. G. Sanger, B. J. Dave, J. C. Lynch, J. Vose, J. O. Armitage, R. I. Fisher, T. P. Miller, M. LeBlanc, G. Ott, S. Kvaloy, H. Holte, J. Delabie and L. M. Staudt (2003). "The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma." *Cancer Cell* **3**(2): 185-197.
- Ruiz-Ballesteros, E., M. Mollejo, M. Mateo, P. Algara, P. Martínez and M. A. Piris (2007). "MicroRNA losses in the frequently deleted region of 7q in SMZL." *Leukemia* **21**(12): 2547-2549.
- Ruiz-Ballesteros, E., M. Mollejo, A. Rodriguez, F. I. Camacho, P. Algara, N. Martinez, M. Pollan, A. Sanchez-Aguilera, J. Menarguez, E. Campo, P. Martinez, M. Mateo and M. A. Piris (2005). "Splenic marginal zone lymphoma: proposal of new diagnostic and prognostic markers identified after tissue and cDNA microarray analysis." *Blood* **106**(5): 1831-1838.
- Salama, M. E., I. S. Lossos, R. A. Warnke and Y. Natkunam (2009). "Immunoarchitectural patterns in nodal marginal zone B-cell lymphoma: a study of 51 cases." *Am J Clin Pathol* **132**(1): 39-49.
- Salido, M., C. Baró, D. Oscier, K. Stamatopoulos, J. Dierlamm, E. Matutes, A. Traverse-Glehen, F. Berger, P. Felman, C. Thieblemont, S. Gesk, A. Athanasiadou, Z. Davis, A. Gardiner, F. Milla, A. Ferrer, M. Mollejo, M. J. Calasanz, L. Florensa, B. Espinet, E. Luño, I. Wlodarska, G. Verhoef, M. García-Granero, A. Salar, T. Papadaki, S. Serrano, M. A. Piris and F. Solé (2010). "Cytogenetic aberrations and their prognostic value in a series of 330 splenic marginal zone B-cell lymphomas: a multicenter study of the Splenic B-Cell Lymphoma Group." *Blood* **116**(9): 1479-1488.
- Schena, M., D. Shalon, R. W. Davis and P. O. Brown (1995). "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray." *Science* **270**(5235): 467-470.

- Schroers, R., F. Griesinger, L. Trümper, D. Haase, B. Kulle, L. Klein-Hitpass, L. Sellmann, U. Dührsen and J. Dürig (2005). "Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia." *Leukemia* **19**(5): 750-758.
- Shanafelt, T. D., P. Ghia, M. C. Lanasa, O. Landgren and A. C. Rawstron (2010). "Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): biology, natural history and clinical management." *Leukemia* **24**(3): 512-520.
- Sheibani, K., C. C. Sohn, J. S. Burke, C. D. Winberg, A. M. Wu and H. Rappaport (1986). "Monocytoid B-cell lymphoma. A novel B-cell neoplasm." *Am J Pathol* **124**(2): 310-318.
- Shen, Y., J. Iqbal, L. Xiao, R. C. Lynch, A. Rosenwald, L. M. Staudt, S. Sherman, K. Dybkaer, G. Zhou, J. D. Eudy, J. Delabie, T. W. McKeithan and W. C. Chan (2004). "Distinct gene expression profiles in different B-cell compartments in human peripheral lymphoid organs." *BMC Immunol* **5**: 20.
- Shi, X., L. Leng, T. Wang, W. Wang, X. Du, J. Li, C. McDonald, Z. Chen, J. Murphy, E. Lolis, P. Noble, W. Knudson and R. Bucala (2006). "CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex." *Immunity* **25**(4): 595-606.
- Song, R., Y. W. Kim, B. K. Koo, H. W. Jeong, M. J. Yoon, K. J. Yoon, D. J. Jun, S. K. Im, J. Shin, M. P. Kong, K. T. Kim, K. Yoon and Y. Y. Kong (2008). "Mind bomb 1 in the lymphopoietic niches is essential for T and marginal zone B cell development." *J Exp Med* **205**(11): 2525-2536.
- Sonkoly, E. and A. Pivarcsi (2009). "Advances in microRNAs: implications for immunity and inflammatory diseases." *J Cell Mol Med* **13**(1): 24-38.
- Stamatopoulos, B., N. Meuleman, B. Haibe-Kains, P. Saussoy, E. Van Den Neste, L. Michaux, P. Heimann, P. Martiat, D. Bron and L. Lagneaux (2009). "microRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification." *Blood* **113**(21): 5237-5245.
- Starlets, D., Y. Gore, I. Binsky, M. Haran, N. Harpaz, L. Shvidel, S. Becker-Herman, A. Berrebi and I. Shachar (2006). "Cell-surface CD74 initiates a signaling cascade leading to cell proliferation and survival." *Blood* **107**(12): 4807-4816.
- Stary, S., U. Vinatzer, L. Müllauer, M. Raderer, P. Birner and B. Streubel (2013). "t(11;14)(q23;q32) involving IGH and DDX6 in nodal marginal zone lymphoma." *Genes Chromosomes Cancer* **52**(1): 33-43.
- Stein, R., M. Mattes, T. Cardillo, H. Hansen, C. Chang, J. Burton, S. Govindan and D. Goldenberg (2007). "CD74: a new candidate target for the immunotherapy of B-cell neoplasms." *Clin Cancer Res* **13**(18 Pt 2): 5556s-5563s.
- Suarez, F., O. Lortholary, O. Hermine and M. Lécuit (2006). "Infection-associated lymphomas derived from marginal zone B cells: a model of antigen-driven lymphoproliferation." *Blood* **107**(8): 3034-3044.
- Swerdlow, S. H., E. Campo, N. L. Harris, E. S. Jaffe, S. A. Pileri, H. Stein, J. Thiele and J. W. Vardiman (2008). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, International Agency for Research on Cancer (IARC).
- Szynglarewicz, B., R. Matkowski, Z. Smorag, J. Forgacz, M. Pudelko and J. Kornafel (2007). "Hepatitis C virus infection and locally advanced splenic marginal zone lymphoma." *Pathol Oncol Res* **13**(4): 382-384.

- Tan, L. P., M. Wang, J. L. Robertus, R. N. Schakel, J. H. Gibcus, A. Diepstra, G. Harms, S. C. Peh, R. M. Reijmers, S. T. Pals, B. J. Kroesen, P. M. Kluin, S. Poppema and A. van den Berg (2009). "miRNA profiling of B-cell subsets: specific miRNA profile for germinal center B cells with variation between centroblasts and centrocytes." *Lab Invest* **89**(6): 708-716.
- Tandon, B., L. Peterson, J. Gao, B. Nelson, S. Ma, S. Rosen and Y. H. Chen (2011). "Nuclear overexpression of lymphoid-enhancer-binding factor 1 identifies chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma in small B-cell lymphomas." *Mod Pathol* **24**(11): 1433-1443.
- Thai, T. H., D. P. Calado, S. Casola, K. M. Ansel, C. Xiao, Y. Xue, A. Murphy, D. Frendewey, D. Valenzuela, J. L. Kutok, M. Schmidt-Supprian, N. Rajewsky, G. Yancopoulos, A. Rao and K. Rajewsky (2007). "Regulation of the germinal center response by microRNA-155." *Science* **316**(5824): 604-608.
- Thieblemont, C., V. Nasser, P. Felman, K. Leroy, S. Gazzo, E. Callet-Bauchu, B. Loricod, S. Granjeaud, P. Gaulard, C. Haioun, A. Traverse-Glehen, L. Baseggio, F. Bertucci, D. Birnbaum, F. Magrangeas, S. Minvielle, H. Avet-Loiseau, G. Salles, B. Coiffier, F. Berger and R. Houlgatte (2004). "Small lymphocytic lymphoma, marginal zone B-cell lymphoma, and mantle cell lymphoma exhibit distinct gene-expression profiles allowing molecular diagnosis." *Blood* **103**(7): 2727-2737.
- Tiwari, M. (2011). "Lymphomas: its gene expression profiling." *J Cancer Res Ther* **7**(4): 393-398.
- Tracey, L., A. Pérez-Rosado, M. J. Artiga, F. I. Camacho, A. Rodríguez, N. Martínez, E. Ruiz-Ballesteros, M. Mollejo, B. Martinez, M. Cuadros, J. F. Garcia, M. Lawler and M. A. Piris (2005). "Expression of the NF-kappaB targets BCL2 and BIRC5/Survivin characterizes small B-cell and aggressive B-cell lymphomas, respectively." *J Pathol* **206**(2): 123-134.
- Traverse-Glehen, A., F. Bertoni, C. Thieblemont, E. Zucca, B. Coiffier, F. Berger and G. Salles (2012). "Nodal marginal zone B-cell lymphoma: a diagnostic and therapeutic dilemma." *Oncology (Williston Park)* **26**(1): 92-99, 103-104.
- Traverse-Glehen, A., F. Davi, E. Ben Simon, E. Callet-Bauchu, P. Felman, L. Baseggio, S. Gazzo, C. Thieblemont, C. Charlot, B. Coiffier, F. Berger and G. Salles (2005). "Analysis of VH genes in marginal zone lymphoma reveals marked heterogeneity between splenic and nodal tumors and suggests the existence of clonal selection." *Haematologica* **90**(4): 470-478.
- Traverse-Glehen, A., P. Felman, E. Callet-Bauchu, S. Gazzo, L. Baseggio, P. A. Bryon, C. Thieblemont, B. Coiffier, G. Salles and F. Berger (2006). "A clinicopathological study of nodal marginal zone B-cell lymphoma. A report on 21 cases." *Histopathology* **48**(2): 162-173.
- Troen, G., V. Nygaard, T. K. Jenssen, I. M. Ikonomou, A. Tierens, E. Matutes, A. Gruszka-Westwood, D. Catovsky, O. Myklebost, G. Lauritzen, E. Hovig and J. Delabie (2004). "Constitutive expression of the AP-1 transcription factors c-jun, junD, junB, and c-fos and the marginal zone B-cell transcription factor Notch2 in splenic marginal zone lymphoma." *J Mol Diagn* **6**(4): 297-307.
- Vallisa, D., P. Bernuzzi, L. Arcaini, S. Sacchi, V. Callea, R. Marasca, A. Lazzaro, E. Trabacchi, E. Anselmi, A. L. Arcari, C. Moroni, R. Bertè, M. Lazzarino and L. Cavanna (2005). "Role of anti-hepatitis C virus (HCV) treatment in HCV-related, low-grade, B-cell, non-Hodgkin's lymphoma: a multicenter Italian experience." *J Clin Oncol* **23**(3): 468-473.
- Vasilatou, D., S. Papageorgiou, V. Pappa, E. Papageorgiou and J. Dervenoulas (2010). "The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis." *Eur J Haematol* **84**(1): 1-16.

- Vendrame, E. and O. Martínez-Maza (2011). "Assessment of pre-diagnosis biomarkers of immune activation and inflammation: insights on the etiology of lymphoma." *J Proteome Res* **10**(1): 113-119.
- Ventura, A., A. G. Young, M. M. Winslow, L. Lintault, A. Meissner, S. J. Erkeland, J. Newman, R. T. Bronson, D. Crowley, J. R. Stone, R. Jaenisch, P. A. Sharp and T. Jacks (2008). "Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters." *Cell* **132**(5): 875-886.
- Venturini, L., K. Battmer, M. Castoldi, B. Schultheis, A. Hochhaus, M. U. Muckenthaler, A. Ganser, M. Eder and M. Scherr (2007). "Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells." *Blood* **109**(10): 4399-4405.
- Verkoczy, L. K., B. Guinn and N. L. Berinstein (2000). "Characterization of the human B cell RAG-associated gene, hBRAG, as a B cell receptor signal-enhancing glycoprotein dimer that associates with phosphorylated proteins in resting B cells." *J Biol Chem* **275**(28): 20967-20979.
- Wada, K., K. Maeda, K. Tajima, T. Kato, T. Kobata and M. Yamakawa (2009). "Expression of BAFF-R and TACI in reactive lymphoid tissues and B-cell lymphomas." *Histopathology* **54**(2): 221-232.
- Weill, J. C., S. Weller and C. A. Reynaud (2009). "Human marginal zone B cells." *Annu Rev Immunol* **27**: 267-285.
- Wiestner, A., A. Rosenwald, T. S. Barry, G. Wright, R. E. Davis, S. E. Henrickson, H. Zhao, R. E. Ibbotson, J. A. Orchard, Z. Davis, M. Stetler-Stevenson, M. Raffeld, D. C. Arthur, G. E. Marti, W. H. Wilson, T. J. Hamblin, D. G. Oscier and L. M. Staudt (2003). "ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile." *Blood* **101**(12): 4944-4951.
- Wotherspoon, A. C., C. Ortiz-Hidalgo, M. R. Falzon and P. G. Isaacson (1991). "Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma." *Lancet* **338**(8776): 1175-1176.
- Wrzesinski, S. H., Y. Y. Wan and R. A. Flavell (2007). "Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy." *Clin Cancer Res* **13**(18 Pt 1): 5262-5270.
- Xiao, C., D. P. Calado, G. Galler, T. H. Thai, H. C. Patterson, J. Wang, N. Rajewsky, T. P. Bender and K. Rajewsky (2007). "MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb." *Cell* **131**(1): 146-159.
- Yauk, C. L. and M. L. Berndt (2007). "Review of the literature examining the correlation among DNA microarray technologies." *Environ Mol Mutagen* **48**(5): 380-394.
- Zarnegar, B. J., Y. Wang, D. J. Mahoney, P. W. Dempsey, H. H. Cheung, J. He, T. Shiba, X. Yang, W. C. Yeh, T. W. Mak, R. G. Korneluk and G. Cheng (2008). "Noncanonical NF-kappaB activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK." *Nat Immunol* **9**(12): 1371-1378.
- Zhang, J., D. D. Jima, C. Jacobs, R. Fischer, E. Gottwein, G. Huang, P. L. Lugar, A. S. Lagoo, D. A. Rizzieri, D. R. Friedman, J. B. Weinberg, P. E. Lipsky and S. S. Dave (2009). "Patterns of microRNA expression characterize stages of human B-cell differentiation." *Blood* **113**(19): 4586-4594.
- Zhu, D. X., W. Zhu, C. Fang, L. Fan, Z. J. Zou, Y. H. Wang, P. Liu, M. Hong, K. R. Miao, W. Xu and J. Y. Li (2012). "miR-181a/b significantly enhances drug sensitivity in chronic lymphocytic leukemia cells via targeting multiple anti-apoptosis genes." *Carcinogenesis* **33**(7): 1294-1301.

Zibellini, S., D. Capello, F. Forconi, P. Marcatili, D. Rossi, S. Rattotti, S. Franceschetti, E. Sozzi, E. Cencini, R. Marasca, L. Baldini, A. Tucci, F. Bertoni, F. Passamonti, E. Orlandi, M. Varettoni, M. Merli, S. Rizzi, V. Gattei, A. Tramontano, M. Paulli, G. Gaidano and L. Arcaini (2010). "Stereotyped patterns of B-cell receptor in splenic marginal zone lymphoma." Haematologica **95**(10): 1792-1796.

Zuckerman, E., T. Zuckerman, A. M. Levine, D. Douer, K. Gutekunst, M. Mizokami, D. G. Qian, M. Velankar, B. N. Nathwani and T. L. Fong (1997). "Hepatitis C virus infection in patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma." Ann Intern Med **127**(6): 423-428.



ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxiribonucleico
ADNc: Ácido desoxiribonucleico complementario
ANC: Análisis de número de copias
ANOVA: *ANalysis Of Variance*
AO: Actividad oncogénica
ARN: Ácido ribonucleico
ARNc: Ácido ribonucleico complementario
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
BCL2: *B cell lymphoma 2*
BCL6: *B cell lymphoma 6*
BCR: Receptor de célula B
BHR: Bazos con hiperplasia reactiva
C. Com.: Casa comercial
CAPweb: *Copy number Array analysis Platform on the web*
CBM: Célula B de memoria
CG: Centro germinal
CGH: *Comparative genomic hybridization*
CHIT1: *Chitinase 1*
CIP: Fosfatasa intestinal de ternera
CMH II: Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
CNIO: Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
CTP: Cianina tri-fosfato
DMSO: Dimetil sulfóxido
ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*
EXPANDER: *Expression Analyzer and DisplayER*
FC: *Fold change*
FCS: Suero fetal de ternera
FDR: *False Discovery Rate*
FISH: *Fluorescence in situ hybridization*
FLIPI: *Follicular Lymphoma International Prognostic Index*
GEPAS: *Gene Expression Patterns Analysis Suite*
GLR: Ganglio linfático con hiperplasia folicular reactiva
GSEA: *Gene Set Enrichment Analysis*
HVS: Hospital Virgen de la Salud de Toledo
IFN γ : Interferón gamma
Ig: Inmunoglobulina
IgA: Inmunoglobulina A
IgD: Inmunoglobulina D
IgG: Inmunoglobulina G
IgM: Inmunoglobulina M
IgV_H: Dominio variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina
IHQ: Inmunohistoquímica
IKIP: *Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase-interacting protein*
IPI: *International Prognostic Index*
LBDCG: Linfoma B difuso de célula grande
LBM: Linfocitosis B monoclonal
LCM: Linfoma de células del manto
LDH: Lactato deshidrogenasa
LEZM: Linfoma esplénico de la zona marginal
LEZM-G: Linfoma esplénico de la zona marginal diseminado al ganglio

LF: Linfoma folicular
LH: Linfoma de Hodgkin
LLA: Leucemia linfoblástica aguda
LLC: Leucemia linfática crónica
LMC: Leucemia mieloide crónica
LMO2: *LIM domain only protein 2*
LPA: Leucemia promielocítica aguda
LZM: Linfoma de la zona marginal
LZMG: Linfoma de la zona marginal ganglionar
LZM-MALT: Linfoma de la zona marginal de tipo MALT
MALT: Tejido linfoide asociado a mucosas
miRNA: *microRNA*
MM: Mieloma múltiple
MN: Zona del manto
NF- κ B: factor de transcripción nuclear *kappa B*
NOTCH2: *Neurogenic locus notch homolog protein 2*
NV: No valorable
OMS: Organización Mundial de la Salud
pb: pares de bases
PBS: Tampón fosfato salino
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PRDM1: *PR domain zinc finger protein 1*
pre-miRNA: *precursor miRNA*
pri-miRNA: *primary transcript miRNA*
PTN INS: Fosfatidil inositol
qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real
R. Cons.: Resultados consistentes
RHOH: *Rho-related GTP-binding protein Rho, type H*
SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*
Sobre. Exp.: Sobreexpresión
SOTA: *Self-Organizing Tree Algorithm*
ST: Supresor de tumores
TACI: *Transmembrane activator and CAML interactor*
TCL1: *T cell lymphoma 1*
TCR: Receptor de célula T
TGFB: *Transforming growth factor beta*
TI-2: Respuesta inmune timo independiente de tipo 2
TNF: *Tumor nuclear factor*
TNFAIP3: *tumor nuclear factor activating protein 3*
TNFR: *Tumor nuclear factor receptor*
ULS-Cy5(3): *Universal linkage system with cyanine 5 (3)*
UPGMA: *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*
UTR: *Untranslated region*
VHC: Virus de la Hepatitis C
ZM: Zona del marginal
ZMn: Zona marginal normal



ANEXO I

ARTICULO I

Arribas, A. J. Campos-Martín, Y. Gómez-Abad, C. Algara, P. Sánchez-Beato, M. Rodríguez-Pinilla, M. S. Montes-Moreno, S. Martínez, N. Alves-Ferreira, J. Piris, M. A. Mollejo, M. (2012). "**Nodal marginal zone lymphoma: gene expression and miRNA profiling identify diagnostic markers and potential therapeutic targets.**" Blood 119(3): e9-e21.

e-Blood

Nodal marginal zone lymphoma: gene expression and miRNA profiling identify diagnostic markers and potential therapeutic targets

Alberto J. Arribas,¹ Yolanda Campos-Martín,¹ Cristina Gómez-Abad,² Patrocinio Algara,¹ Margarita Sánchez-Beato,² María S. Rodríguez-Pinilla,² Santiago Montes-Moreno,³ Nerea Martínez,³ Javier Alves-Ferreira,⁴ Miguel A. Piris,³ Manuela Mollejo¹

¹Virgen de la Salud Hospital, Toledo, Spain; ²Spanish National Cancer Research Centre, Madrid, Spain; ³Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla (IFIMAV), Santander, Spain; and ⁴Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

Nodal marginal zone lymphoma (NMZL) is a small B-cell neoplasm whose molecular pathogenesis is still essentially unknown and whose differentiation from other small B-cell lymphomas is hampered by the lack of specific markers. We have analyzed gene expression, miRNA profile, and copy number data from 15 NMZL cases. For comparison, 16 follicular lymphomas (FLs), 9 extranodal marginal zone lymphomas, and 8 reactive lymph nodes and B-cell subtypes were included. The

results were validated by quantitative RT-PCR in an independent series, including 61 paraffin-embedded NMZLs. NMZL signature showed an enriched expression of gene sets identifying interleukins, integrins, *CD40*, *PI3K*, *NF-κB*, and *TGF-β*, and included genes expressed by normal marginal zone cells and memory B cells. The most highly overexpressed genes were *SYK*, *TACI*, *CD74*, *CD82*, and *CDC42EP5*. Genes linked to G₂/M and germinal center were down-regulated. Comparison of the

gene expression profiles of NMZL and FL showed enriched expression of *CHIT1*, *TGFB1*, and *TACI* in NMZL, and *BCL6*, *LMO2*, and *CD10* in FL. NMZL displayed increased expression of *miR-221*, *miR-223*, and *let-7f*, whereas FL strongly expressed *miR-494*. Our study identifies new candidate diagnostic molecules for NMZL and reveals survival pathways activated in NMZL. (*Blood*. 2012;119(3):e9-e21)

Introduction

The term marginal zone lymphoma (MZL) encompasses 3 rather unrelated lymphoma subtypes: the extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma), the nodal marginal zone lymphoma (NMZL), and splenic B-cell marginal zone lymphoma (SMZL). In the World Health Organization Classification of Tumors,¹ all 3 types of MZL are considered distinct clinicopathologic entities. NMZL is an uncommon form of small B-cell neoplasm originating in the lymph node, whose morphology resembles lymph nodes involved in MZL of the extranodal or splenic types, but without evidence of extranodal or splenic disease. The relative rarity of NMZLs, which account for fewer than 2% of all lymphoid neoplasms, is a significant obstacle to their molecular investigation.¹ Genomic alterations, including translocations and genomic copy number alterations, are important events in lymphomagenesis,¹ providing diagnostic markers and potential therapeutic targets. However, no characteristic translocations or chromosome imbalances have been described in NMZL. Alterations reported in other MZLs, such as the t(11;18) in MALT-type² and the loss of 7q in SMZL,^{1,3} have not been found in NMZL cases. Only a few cytogenetic alterations of NMZL have been reported, including trisomy 3 in 50% to 70% of cases. More recently, inactivating mutations encoding truncated *A20* proteins have been found in various types of MZL, including 3 of 9 NMZL cases.⁴ *A20* is the protein coded by *TNFAIP3* gene, a negative regulator of NF-κB, located in a frequently lost chromosomal region (6q21-q25).⁴⁻⁶ Other alterations described to date are

rearrangements involving 1p/q, +3/3q, +12, and +18.¹ The absence of molecular or phenotypic markers hinders accurate diagnosis and the differential diagnosis of NMZL from other types of B-cell lymphomas, specifically follicular lymphoma (FL) and reactive lymphoid hyperplasia. Thirteen NMZLs and 8 FLs in this series of cases were included in a previous study by our group that identified *MNDA* as a marker of potential diagnostic value in NMZL.⁷ Some cases of NMZL were classified in the past as monocytoid B-cell lymphomas and linked with the marginal zone.⁸ The normal marginal zone is present in the secondary lymphoid follicles as a concentric area surrounding the mantle follicle and is composed basically of B lymphocytes, macrophages, granulocytes, and dendritic cells that are specialized to capture blood-borne antigens and present them to the resident marginal zone B cells.⁹ The majority of these MZ cells have an IgM^{high}, IgD^{low}, and CD27⁺ phenotype and exhibit somatic hypermutation in their Ig-variable genes, according to the data showing that this zone contains mainly memory B cells.⁹ MZ B cells are involved in early immune response, and the gene expression profile of normal MZ B cells exhibits strong expression of genes, such as *CARD11*, *CXCL12*, *CXCR6*, *TACI*, *MMP12*, *APRIL*, *LTB*, *IFNGR1*, *COL3A1*, *AKAP13*, and *IL2R*.¹⁰

Gene expression profiles (GEPs) have been obtained for other low-grade B-cell lymphomas, such as FL,¹¹ SMZL,¹² and MALT lymphoma.¹³ These gene expression studies have enabled the identification of genes and pathways related to pathogenesis and of

Submitted February 28, 2011; accepted October 16, 2011. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, November 22, 2011; DOI 10.1182/blood-2011-02-339556.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2012 by The American Society of Hematology

Table 1. Clinical characteristics of NMZL patient series

Case no.	Age, y/sex	Clinical stage	HCV	IGHV gene	ID, % homology	Treatment	Outcome (mo)
1	60/F	III	Negative	VH3-33	98.2	CHT	CR (120)
2	80/M	II	ND	VH4-39	94	RT	AWD (64)
3	74/F	I	ND	VH3-72	93	ND	AWD (30)
4	76/F	III	ND	NR	—	CHT	CR (24)
5	73/F	III	Negative	NR	—	CHT	DOD (18)
6	62/F	ND	ND	NR	—	ND	ND
7	65/F	ND	ND	VH4-34/VH3-7	95.9/89.6	ND	ND
8	82/F	III	Negative	VH4-39	92.3	CHT	DXT (54)
9	71/M	IV	Positive	VH3-74	97.3	CHT	AWD (19)
10	76/M	I	ND	VH3-21	93.8	ND	ND
11	55/F	IV	Positive	NR	—	CHT	AWD (34)
12	69/F	III	Negative	NR	—	ND	CR (25)
13	62/M	I	ND	NR	—	RT	CR (46)
14	80/M	IV	ND	VH3-23/VH4b	89.3/91.1	CHT	DXT (13)
15	53/M	IV	ND	VH3-11	89.7	CHT	DOD (7)

NMZL patients had a median age of 68.5 y (range, 53-82 y); 64% of them were women.

ID indicates identity frequency; CHT, chemotherapy; CR, complete remission; ND, not determined; RT, radiotherapy; AWD, alive with disease; NR, no rearrangement; —, not applicable; DOD, dead of disease; and DXT, dead, nonlymphoma-related.

subgroups with distinct pathologic and clinical features and have led to the proposal of new therapeutic targets. However, molecular pathogenesis is essentially unknown in NMZL, and the gene expression profile has yet to be fully described.

miRNAs are 21- to 23-nt-long RNA molecules that regulate the expression of protein-coding genes. More than 700 miRNAs have been identified in mammals and are known to play a role in multiple biologic functions. B-cell differentiation is tightly regulated by miRNAs, and the expression of characteristic sets of miRNAs distinguishes specific stages of B-cell differentiation and B-cell lymphoma main tumor types.^{14,15} The miRNA profile in NMZL has not been described so far, but memory B cells have been shown to display an increased expression of *miR-223*, *miR-146b*, and *miR-150*, and members of the *miR-29* and *miR-181* families and *let-7* cluster, among others.^{15,16}

The aim of this study was to improve our knowledge of the molecular mechanisms involved in NMZL, to find new diagnostic markers of use for its differential diagnosis from other small B-cell lymphomas and reactive therapeutic targets.

Methods

Patients and tissue samples

The series included 15 patients with NMZL. Clinical information about NMZL cases was retrieved from medical records, surgical pathology reports, and the referring clinicians (Table 1). For comparison purposes, we included B-cell subtypes and a set of 33 lymph node samples: 8 lymph nodes with reactive lymphoid hyperplasia (RLN), 5 lymph nodes infiltrated by MALT lymphoma (MZL-MALT), 4 lymph nodes with SMZL, and 16 lymph nodes infiltrated by FL. The criterion for inclusion was the availability of frozen tissue from the diagnostic lymph node specimens in each case. Morphologic examination and CD20 immunostaining revealed the percentage of tumoral cells exceeding 75% in all cases in this study.

To validate the levels of gene expression and miRNA profiles found by microarray analysis, a quantitative RT-PCR experiment was performed with formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues from an independent series, including 125 cases: 61 NMZL, 57 FL, and 7 RLN.

All cases were selected from the routine and consultation files of the Pathology and Genetics Laboratories of the Virgen de la Salud Hospital (HVS, Toledo, Spain), the Spanish National Cancer Research Center (Madrid, Spain), and the Spanish Tumor Bank Network. Cases were

diagnosed on the basis of morphology, immunophenotype, and molecular findings according to the World Health Organization classification criteria.¹ Research was performed under the supervision of the Institutional Review Board of the HVS, Toledo, Spain.

Selection of B-cell subsets

B-cell populations were obtained by magnetic cell separation from 6 patients undergoing routine tonsillectomy. The germinal center (GC) B cells were recognized by CD38^{high} IgD⁺, CD27⁺, and CD10⁺ expression, whereas memory B cells were isolated by stainings with CD38^{low}, CD27⁺, IgD^{low}, and CD10⁺. The complete procedure for isolating B-cell subsets is described in supplemental Material 1 (available on the Blood Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article).

RNA and DNA isolation

For GEP and miRNA hybridization, total RNA was isolated from each B-cell subset, 40 frozen tumoral blocks and 8 control samples from RLN by TRIzol Reagent (Invitrogen) following the manufacturer's recommendations. The quality of the RNA produced was checked by 1% agarose electrophoresis. Cases with poor-quality RNA were discarded.

Copy number alteration (CNA) was assayed with the DNA from 15 NMZL of frozen-tissue cases, extracted using the standard phenol-chloroform protocol.

Microarray procedures: GEP, miRNA, and CNA hybridization

RNA for GEP was hybridized on a Whole Human Genome Agilent 4 × 44K Oligonucleotide Microarray (Agilent Technologies) as reported.¹⁷

The miRNA microarray experiments were done using the Agilent Human miRNA Microarray (V1), 8 × 15K (Agilent Technologies). For each tissue sample, 100 ng total RNA was hybridized with the miRNA array and further processed as previously described.¹⁸

For CNA, the DNA was hybridized on an Agilent Human Genome CGH Microarray Kit 4 × 44K (Agilent Technologies) as described.¹⁹ Human female- and male-pooled gDNA (Promega) was used to normalize the comparative genomic hybridization (CGH) results. Results were considered valuable in 14 cases. The samples (1 μg DNA) were labeled with Cy5, and the DNA donor pool was labeled with Cy3. The commonly affected regions were compared with the Database of Genomic Variants (<http://projects.t-cag.ca/variation>): regions with an overlap of more than 80% between probes and known copy number variations were considered bona fide copy number variations and excluded from further analysis.

All microarray data can be viewed at the Gene Expression Omnibus under the following accession numbers: superseries data under accession

number GSE32233, gene expression data under GSE32231, miRNAs data under GSE32232, and CGH data under GSE32436.

Microarray data analysis: GEP, miRNA, B-cell subsets

The background subtraction of microarray data was carried out using GEPAS Version 4.0 (<http://gepas.bioinfo.cipf.es>). The dataset was normalized by lowess within-array normalization and quantile between-array normalization, and then preprocessed.

We used ANOVA and *t* tests (<http://pomelo2.bioinfo.cnio.es/>) to compare the expression of the NMZL gene and miRNA signatures with that of the RLN, with the other MZL subtypes (SMZL and MALT lymphoma) and FL. In all these comparisons, the genes and the miRNAs with false discovery rate (FDR) < 0.05 were considered significant.

The *t* statistic in gene set enrichment analysis (GSEA; <http://www.broad.mit.edu/gsea/>) was calculated to identify the pathways and functional groups enriched in the NMZL signature. The GSEA gene sets used were selected from a curated version of Biocarta, KEGG, and CCG pathway databases, as previously described.²⁰ The gene sets with values of *P* < .05 and FDR < 0.25 were considered to be enriched and potentially relevant in each case.

CNA was normalized using CAPweb Version 2.0²¹ from the Curie Institute (<http://bioinfo-out.curie.fr/CAPweb>).

miRNA target prediction and miRNA target correlation

We followed the previously described procedure²² to identify associations between differentially expressed miRNAs (FDR < 0.05) and gene expression signatures (FDR < 0.05). The GSEA (Pearson correlation) was used to test the enrichment of gene sets related to each corresponding miRNA. Those with values of *P* < .05 and FDR < 0.25 were considered to be enriched in each case.

Quantitative real-time RT-PCR analysis

To validate GEP and miRNA microarray data, we carried out a quantitative RT-PCR assay. Total RNA was extracted from FFPE sections of an independent patient group following the manufacturer's instructions using an miRNeasy FFPE Kit (QIAGEN).

Quantitative RT-PCR experiments were performed on selected genes, on the tested miRNAs, and on each B-cell subset using TaqMan probes (Applied Biosystems) as previously described.^{12,22} The relative degree of change for each gene and miRNA was calculated using the $RQ = 2^{-\Delta Ct}$ method (for GEP $\Delta Ct = (Ct_{\text{gene}} - Ct_{\text{GAPDH}})$ and for miRNAs $\Delta Ct = (Ct_{\text{miRNA}} - Ct_{\text{U6}})$) with *GAPDH* as the GEP endogenous control and *RNU6B* as the miRNA endogenous control. *C_t* values of at least 36 were considered beyond the limit of detection.

The *t* test and one-way ANOVA (SPSS Version 17.0) were used, and the genes and miRNAs with values of *P* < .05 were considered significant.

Immunostaining techniques

A series of FFPE were analyzed using IHC by staining 2- to 4- μ m-thick sections, following the Dako EnVision FLEX procedure (Dako Denmark). Some of the most relevant genes in the assay, such as *CD82*, *TACI*, *CD44*, *CHIT1*, *TOM1*, and *LASS4*, were studied by IHC. The antibodies used are detailed in (supplemental Table 8).

For immunohistochemical evaluation, cases were scored semiquantitatively, with respect to the number of positive cells and the intensity of the expression. Antibodies producing inconsistent or unreliable results were not quantified. Cases were considered as CD44-positive and LASS4-positive if these markers were expressed in more than 50% of tumoral cells at an intermediate-high intensity, and for CHIT1 when immunostaining was present in more than 10% of macrophage cells.

Results

Nodal marginal zone signature

We have characterized the protein-coding genes and miRNA signature for NMZL and selected B-cell populations. The expression of selected protein-coding genes and miRNAs was validated in a large independent FFPE series by quantitative RT-PCR. Putative targets for the miRNAs were also identified.

Gene expression profiling

Unsupervised hierarchical clustering revealed a relatively homogeneous profile for the entire series, whereby most NMZL, FL, and RLN cases were clustered in well-separated groups (supplemental Figure 1). The expression profiles of lymph nodes infiltrated by NMZL, MZL-MALT, and SMZL were compared statistically revealing no differentially expressed genes, although the analysis of these data should take into consideration the small number of lymph nodes involved in MZL-MALT and SMZL available for study.

Supervised hierarchical clustering identified an NMZL signature containing 264 up-regulated genes and 184 down-regulated genes (Figure 1). The most relevant significantly deregulated genes in the NMZL signature are shown in Table 2 and Figure 1 (complete NMZL signature in supplemental Table 1). The 10 most up-regulated genes were *SYK*, *TACI*, *CD74*, *CD82*, *CDC42EP5*, *TFEB*, *LYN*, *UCP2*, *ACP5*, and *HLA-DMA*. Among the most underexpressed genes were those associated with proliferation and cell cycle (*PBK*, *CD2AP*, and *CDC7*), DNA repair (*RAD54B*, *PSMC3IP*, *MSH2*), GC (*CD10*), meiosis (*MND1*, *MNS1*), chromatin modification (*HDAC2*), cell apoptosis (*BNIP3*, *IKIP*), and extracellular matrix and cell adhesion (*ANXA1*, *LMO7*).

GSEA revealed enriched pathways in NMZL compared with RLN, including IL6, integrins, IL2RB, CD40, RAC-CYCD, TGF β , PTDINS (PIK3C2A), IL2, RELA, and TNFR1 gene sets (Figure 2; Table 3).

miRNA profiling

The *t* test showed 4 miRNAs to be significantly deregulated in NMZL compared with RLN: 3 of them were up-regulated (*miR-221*, *miR-555*, and *miR-29c*) and one was down-regulated (*miR-532-5p*; Table 4; Figure 3; supplemental Figure 3). The prediction targets for *miR-221* and *miR-555* included the repressed genes *LMO2* and *CD10*, whereas *miR-532-5p* showed targets in the up-regulated *SYK*, *LYN*, and *RELA* genes.

The results detailing the relationship between gene sets and miRNAs are shown in supplemental Material 2.

NMZL versus FL

The differential diagnosis of NMZL and FL is not always clear. The microarray data from frozen tissues in 15 samples of NMZL and 16 of FL were used to compare NMZL and FL gene expression and miRNA profiles. The correlation between miRNAs and gene targets was also investigated.

Supervised hierarchical clustering highlighted a list of interesting deregulated genes. NMZL cases had increased expression of *CHIT1*, *TACI*, *TRAF4*, *TGFB1*, *CD82*, *PTPN1*, and *CD44*. Conversely, FL cases were characterized by the increased expression of a series of GC markers, including *CD10* (*MME*), *BCL6*, *GCET1* (*SERPINA9*), and *LMO2*, whereas genes that are normal marginal zone-related, such as *TACI* and *CD44*, were up-regulated in NMZL. Furthermore, NF- κ B-related and binding genes (*TRAF4*,

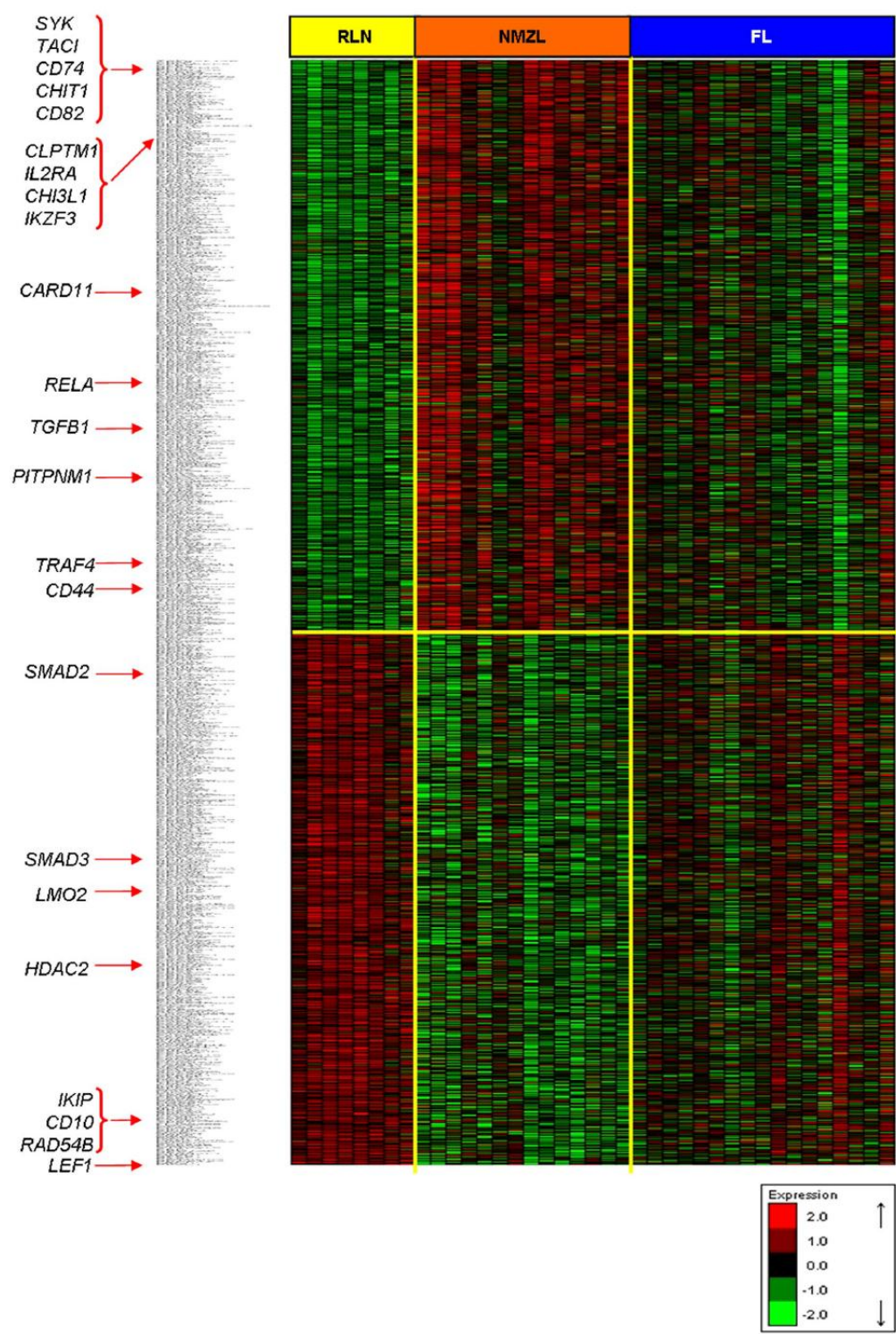


Figure 1. NMZL gene expression signature. Hierarchical clustering of genes with $FDR < 0.10$ in NMZL versus RLN t test comparison. Some relevant genes of the signature are marked with red arrows. Red and green represent high- and low-level expression, respectively.

CD82, *CLIC1*, *CSNK2B*, and *VARS*) were up-regulated in NMZL. In the same way, *IL32*, histones (some isoforms of *HIST1H* and *HIST2H*), *TNF* family members (*TACI*, *TNFRSF14*), and regula-

tory genes involved in lymphocyte activation, such as *CLPTM1* and *TGFB1*, were more highly expressed in NMZL than in FL (Table 2; Figure 1; supplemental Table 2).

Table 2. NMZL gene expression signature: most relevant NMZL signature genes

Gene	NMZL vs RLN comparison		NMZL vs FL comparison		Memory vs GC comparison		Cytoband	Description
	Fold change	FDR	Fold change	FDR	Fold change	P		
<i>TACI</i> *	2.075	0.032	1.987	0.042	0.925	< .001	17p11.2	TNF receptor, B-cell stimulation. NF- κ B activator
<i>CHIT1</i> *	2.044	NS (0.072)	2.527	0.020	-0.234	NS	1q31-q32	Microenvironment involved
<i>CD82</i> *	2.045	0.012	1.727	0.027	0.399	NS	11p11.2	Coactivator for the BCR pathway
<i>CHI3L1</i>	1.588	0.028	1.635	0.029	0.133	ND	1q32.1	Microenvironment involved
<i>CLPTM1</i>	1.652	0.009	1.334	0.049	0.249	ND	19q13.32	Lymphocyte activation
<i>PTPN1</i>	1.487	0.008	1.243	0.026	0.245	ND	20q13.13	Signal transduction
<i>TRAF4</i>	1.036	0.033	1.139	0.022	-0.110	ND	17q11.2	TNF receptor-associated factor; NF- κ B activation
<i>TGF-β1</i> *	1.175	0.010	1.009	0.025	0.371	NS	19q13.2	Cell proliferation and differentiation
<i>CD44</i> *	0.874	0.029	1.285	0.006	1.131	NS	11p13	Adhesion molecule related to marginal zone
<i>SMAD2</i>	-0.837	0.010	-0.712	0.030	0.000	ND	18q21.1	TGF- β signaling pathway
<i>HDAC2</i>	-1.258	0.007	-1.016	0.013	-0.171	ND	6q22.1	Chromatin modification
<i>IKIP</i> *	-1.428	0.029	-1.270	0.045	-0.179	ND	12q23.1	Apoptosis
<i>RAD54B</i> *	-1.775	0.007	-1.291	0.026	-0.241	NS	8q22.1	DNA repair
<i>SMAD3</i>	-2.447	0.029	-1.226	0.044	0.335	ND	6q23.1	TGF- β signaling pathway
<i>LMO2</i> *	-2.533	0.006	-1.732	0.014	-0.545	NS	11p13	GC marker
<i>LEF1</i>	-2.828	0.009	-1.768	0.021	1.682	ND	4q25	Implicated in gene expression transcription
<i>CD10</i>	-4.269	0.006	-2.172	0.041	-0.612	ND	3q32.31	GC marker

Fold changes corresponding to the log2 difference between the NMZL and RLN, NMZL, and FL, and memory B-cell and GC B-cell averages, respectively. FDR and P values are from the *t* test (<http://pomelo2.bioinfo.cnio.es/>).

NS indicates not significant; and ND, not determined.

*To validate the microarray data, the gene was included in the quantitative RT-PCR assay.

GSEA analysis revealed enriched pathways related to memory B cells (IgM⁺ IgD⁻ CD27⁺) in NMZL compared with FL. We also found the *IL10* pathway to be strongly represented in NMZL. Genes linked to the GC were up-regulated in FL (Figure 4).

miRNAs differentially expressed between NMZL and FL were also investigated, revealing 61 deregulated miRNAs: 24 were up-regulated and 37 were repressed in NMZL (Table 4; Figure 3; supplemental Table 3). Some of the up-regulated miRNAs were *miR-223* and *let-7f*, whose putative targets are *LMO2* and cell cycle-related genes, respectively. The functional relationship between *miR-223* and *LMO2* in B cells has already been demonstrated.¹⁶ The *let-7* cluster, including *let-7f* miRNA, is involved in cell cycle regulation and cell division.²³ The miRNAs down-regulated in NMZL included *miR-494*, *miR-765*, *miR-370*, *miR-30d*, *miR-181a*, and *miR-29b*. The miRNAs *miR-370* and *miR-765* have the *TRAF4* and *TGFB1* genes as their respective potential targets. *CCND2* is a putative target of *miR-494* according to the TargetScan algorithm.

NMZL homology with memory B cells

To determine whether NMZL signature has homology with the gene expression patterns of the normal memory B-cell subpopulation, we identified the GEP and miRNA profile of memory B cells and GC B cells. The comparison of the GEP and miRNAs of memory and GC B cells is presented in supplemental Tables 6 and 7.

The most relevant genes and miRNAs that are up-regulated in NMZL cells, including *TACI*, *CD44*, *let-7* family members, and *miR-223*, have been previously described in memory B cells,^{10,13,15,24} whereas the GC B cells showed overexpression of GC markers, such as *CD10*, *BCL6*, and *LMO2* and the miRNAs *miR-28* and *miR-17-5p*, among others. Thus, protein-coding genes and miRNA profiles of NMZL both reproduced the findings obtained for memory B cells, which is consistent with the data showing that memory B cells are the predominant cell population in the human normal marginal zone.²⁴

Validation of microarray data in an independent FFPE series

Microarray results were validated by quantitative RT-PCR and IHC assays in an independent FFPE series. The set of genes selected for validation by quantitative RT-PCR was a combination of those differentially expressed genes that were common in NMZL against RLN and opposite FL comparisons, including *TACI*, *CHIT1*, *CD82*, *TGFB1*, *CD44*, *IKIP*, *RAD54B*, and *LMO2* (Table 2). The selected miRNAs for validation were those with higher differential expression between NMZL versus RLN and NMZL versus FL (Table 4). The genes with higher differential expression between NMZL versus RLN were selected for confirmation by IHC assay (Table 2).

The quantitative RT-PCR analysis showed higher expression levels in NMZL versus FL and versus RLN of *TACI* and *CHIT1* and a lower level of *LMO2* and *RAD54B*, with significant *P* values for all genes. The complete results are shown in Figure 5A. The data for *IKIP* could not be evaluated because the TaqMan probe was not amplified. The differential expression of *miR-221*, *miR-223*, *let-7f*, and *miR-494* was also confirmed (Figure 5B). Quantitative RT-PCR failed to confirm the results concerning *miR-29c*. Data for the miRNAs not shown in Figure 5B could not be evaluated. The results of the ANOVA for the most relevant genes and the miRNAs in the assay are shown in supplemental Table 4. The lack of validation for some genes and miRNAs may be the result of the relatively few cases of RLN in the FFPE series.

CD44 protein expression was significantly higher in the NMZL cases than in FL (*P* = .0157); thus, CD44 was positive in 90% of the NMZL cases but was only expressed in 69% of FL cases. CHIT1 expression, present in macrophages but not in the tumoral cells, was stronger in NMZLs (48%) than in FLs (38%), although this difference was not statistically significant (Figure 6; supplemental Table 8).

Thus, the validation of the NMZL versus RLN comparison was corroborated in 4 of 7 genes (*TACI*, *CHIT1*, *LMO2*, and *RAD54B*) and 1 of 2 miRNAs (*miR-221*). The NMZL versus FL assay was validated in all genes (7 of 7) and all miRNAs (4 of 4): *miR-223*, *let-7f*, *miR-221*, and *miR-494*. Finally, *CD44* was not validated in the NMZL versus RLN comparison by RT-PCR, although it was using IHC.

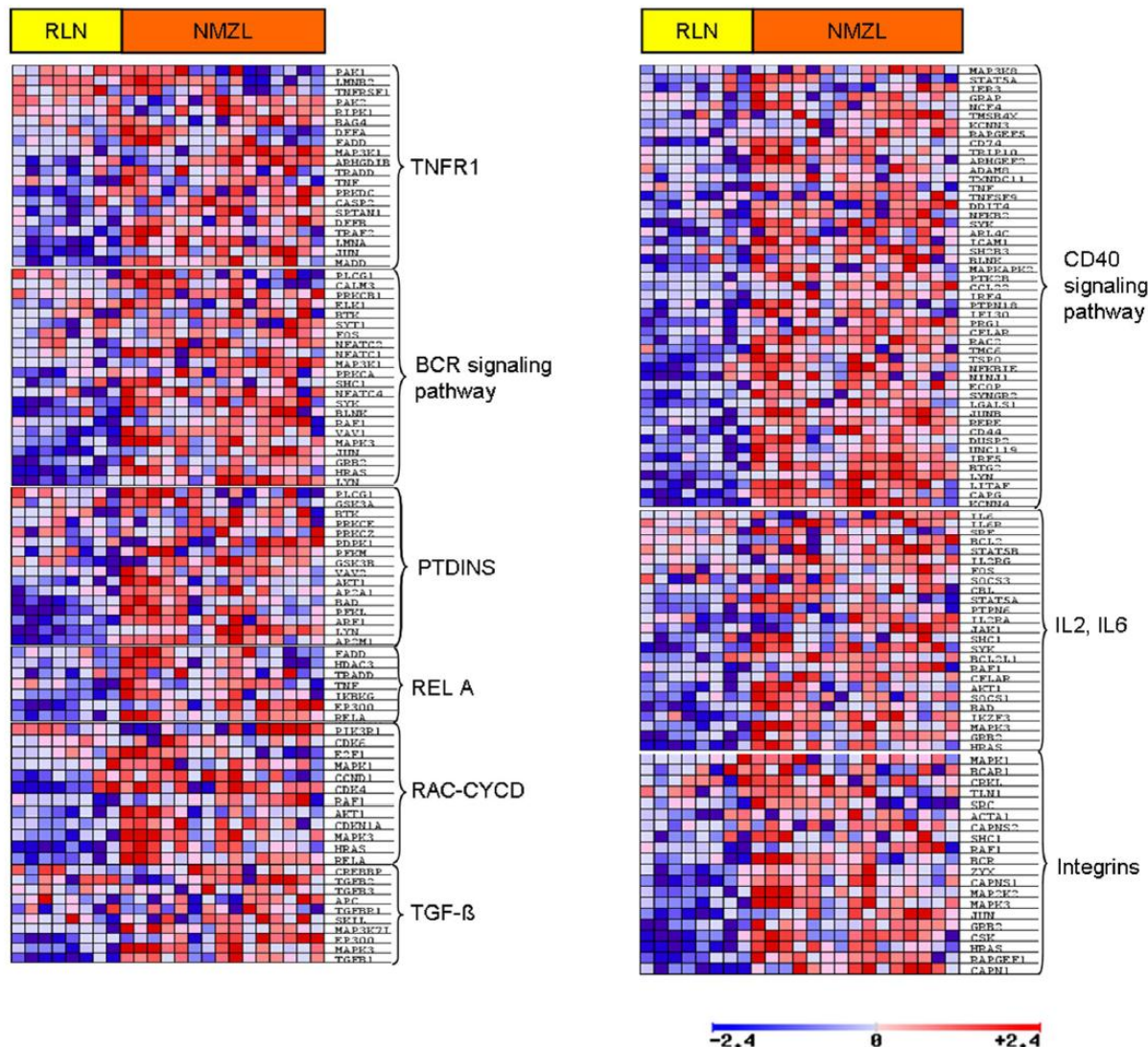


Figure 2. Gene set and pathways enriched in NMZL. The expression of genes representing different B-cell pathways by GSEA analysis (t test). Red and blue represent higher and lower expression, respectively.

CNAs

Details of the CNA analysis are shown in supplemental Table 5 and supplemental Figure 3. This assay revealed gains at various chromosomal sites where we studied the relationship between the CNA and GEP data (Table 5; Figure 7). We found miRNAs belonging to the NMZL signature in several of these gained bands. We also observed a very low frequency of CNA losses.

Discussion

The diagnosis of NMZL is still hampered by the lack of consistent, specific markers. Here we have analyzed the gene expression profile and copy number in a series of cases selected using very conservative diagnostic criteria that excluded all cases with intermediate features or insufficient clinical data. This reduced the number of cases that could be analyzed but improved the chance of identifying specific immunohistochemi-

cal or molecular markers. The gene expression profiles were very similar throughout the NMZL series, which guarantees the homogeneity of data and suggests that NMZL is a unique entity.

The NMZL gene expression profile identified in this way encompasses pathways and genes of the normal marginal zone and memory B cells, the cell subpopulation that occupies the normal marginal zone.²⁴ These findings confirm that NMZL is the tumoral counterpart of marginal zone cells. This corroborates previous observations mainly based on the morphologic analysis of MZLs and suggests that typical MZL cases could be more homogeneous than previously thought.

The gene expression profile of all MZL subtypes described to date^{12,13,25,26} suggests that chronic antigenic stimulation, potentially originating from pathogenic organisms or arising from autoimmune disorders, has an important role in the ontogeny of these tumors. The inflammatory microenvironment, composed of proinflammatory cytokines and cells including antigen-presenting cells and T cells, seems to be crucial in these different lymphoma types.

Table 3. GSEA for NMZL gene expression profile

Gene sets	P	FDR	Up-regulated genes
IL6 pathway	.004	0.177	<i>SHC1, JAK1, CSNK2A1, RAF1, STAT3, JUN, HRAS, MAPK3, GRB2</i>
Integrin pathway	.006	0.135	<i>BCR, RAF1, ZYX, JUN, CAPNS1, CSK, MAP2K2, HRAS, MAPK3, GRB2, RAPGEF1, CAPN1</i>
IL2RB pathway	.004	0.152	<i>SHC1, PTPN6, IL2RA, JAK1, SYK, RAF1, CFLAR, SOCS1, BAD, AKT1, BCL2L1, HRAS, MAPK3, IKZF3, GRB2, CSNK2A1, JUN</i>
CD40 signaling during GC development	.028	0.202	<i>KCNN4, BTG2, CAPG, LYN, LITAF, IRF5, DUSP2, JUNB, CD44, IRF4, CD74, NF-KB2, IFI30, ADAM8, TNF</i>
RAC and CYCD pathway	.021	0.210	<i>RELA, HRAS, MAPK3, CDKN1A, AKT1, RAF1, CDK4</i>
TGF- β pathway	.023	0.210	<i>MAP3K7IP1, EP300, MAPK3, TGF-β1</i>
PTD INS pathway	.028	0.195	<i>PFKM, GSK3B, VAV2, AP2A1, BAD, AKT1, PFKL, ARF1, AP2M1, LYN</i>
IL2 pathway	.030	0.197	<i>SHC1, PTPN6, IL2RA, JAK1, SYK, RAF1, CFLAR, SOCS1, BAD, AKT1, BCL2L1, HRAS, MAPK3, IKZF3, GRB2, CSNK2A1, JUN</i>
RELA pathway	.042	0.203	<i>RELA, EP300, IKBKG, TNF, HDAC3, FADD, TRADD</i>
TNFR1 pathway	.023	0.214	<i>MADD, JUN, LMNA, DFFB, SPTAN1, CASP2, PRKDC, TNF, TRADD, ARHGDI1B, MAP3K1, FADD</i>

The gene sets were considered up-regulated values of $P < .05$ and $FDR < 0.250$ in GSEA analysis using a t test.

Remarkably, in this NMZL series, the GSEA analysis found up-regulation of the *IL6* and *IL2* cytokine pathways, and *CD40* signaling, which are involved in B-cell survival. Other up-regulated cytokines, such as *IFN- γ* and *CD70* (*CD27L*), also appear in the NMZL signature. Accordingly, inflammatory cytokines present in the microenvironment might contribute to the onset and progression of lymphoma or at least contribute to the survival of tumor cells. The overexpression of genes functionally related to processes of antigen presentation, such as class I and class II *HLAs*, and other structurally related genes, such as *CD81* and *CD74*, suggests an important role of the immune response in this lymphoma. *CD74* is critical to MHC class II antigen processing and has been proposed as a candidate target for the immunotherapy of B-cell neoplasms by Stein et al.²⁷ This chaperone was shown to be directly involved in the maturation of B cells through a pathway involving *NF- κ B*.²⁸

TAC1 (*TNFRSF13B*), a transmembrane activator and CAML interactor, is a *TNF* family receptor involved in the TI-2 response for the efficient differentiation from marginal zone B cells to plasma cells.²⁹ *TAC1* has multiple functions in the B cell, apoptosis regulation, and *NF- κ B* canonical and noncanonical (through recruitment of *TRAF2*, *TRAF5*, and *TRAF6*) activation.³⁰ Therefore, *TAC1* should be considered an important gene in the molecular mechanism of NMZL and could be a new candidate for diagnosis and as a therapeutic target. The splenic marginal zone is essential for an

appropriate TI-2 immune response, with absence or dysfunction of the spleen, resulting in an increased risk of infection by pathogens with polysaccharide capsule.³¹ Transforming growth factor β -1 (*TGF β 1*) is a member of the *TGF- β* superfamily, which plays a crucial role in regulating the balance between proliferation and differentiation in hematopoietic cells.³² *TGF β 1* has been ascribed context-dependent³³ contrary functions in hematopoietic cells, with respect to growth inhibition and tumor progression. Increased *TGF β 1* signaling, as seen in NMZL cases, is an indication of the role that other cell subpopulations, macrophages, regulatory T cells, and other cells could play in NMZL pathogenesis.³³

Antigen stimulation and selection of neoplastic cells are thought to occur in gastric MALT lymphoma and SMZL.^{12,13} At present, the role of antigen stimulation in NMZL is unclear, although association with hepatitis C virus (HCV) has been described in a highly variable proportion of cases.³⁴ The small number (2) of HCV-positive cases in our series prevents any firm conclusion being drawn, but the up-regulation of surface molecules and genes functionally related to antigen-presenting processes suggests that antigen stimulation may play a crucial role in the pathogenesis of this lymphoma. *CD81* has been described as being an HCV receptor³⁵ and was up-regulated in the HCV-positive cases.

In addition, the data obtained here seem to identify signaling from *BCR* and coregulated receptors as being essential for NMZL

Table 4. NMZL miRNA signature

Gene	NMZL vs RLN comparison		NMZL vs FL comparison		Memory vs GC comparison		Cytoband	CNA*	Putative prediction targets
	Fold change	FDR	Fold change	FDR	Fold change	P			
<i>miR-223</i>	0.298	NS	0.978	0.009	1.023	NS (.054)	Xq12	—	<i>LMO2, MYBL1</i>
<i>miR-29c</i>	0.809	0.031	0.188	NS	1.081	< .001	1q32.2	—	<i>PTEN, PLAG1, GNB4, MEST</i>
<i>miR-221</i>	0.562	0.002	0.430	0.009	1.057	NS	Xp11.3	Gain	<i>CD10, LMO2</i>
<i>miR-34a</i>	0.432	NS	0.494	0.024	0.992	ND	1p36.22	Gain	<i>LEF1, LASS6, GRSF1, E2F3</i>
<i>let-7f</i>	0.109	NS	0.809	0.008	1.020	< .05	9q22.32	—	<i>SMAD2, LBR, CCDC100</i>
<i>miR-625</i>	0.396	0.092	0.447	0.002	1.010	ND	14q23.3	—	<i>PAG1, SFRS1, BAT3, ABCF3</i>
<i>miR-222</i>	0.330	NS	0.052	NS	1.025	ND	Xp11.3	Gain	<i>MYO10</i>
<i>miR-202</i>	0.320	NS	−0.036	NS	1.045	ND	10q26.3	Gain	<i>MYCBP, LEPROTL1, STX17</i>
<i>miR-765</i>	−0.207	NS	−1.491	0.000	0.990	ND	1q23.1	—	<i>TGF-β1</i>
<i>miR-370</i>	−0.221	NS	−1.961	0.000	0.960	ND	14q32.2	—	<i>TRAF4</i>
<i>miR-513</i>	−0.230	NS	−2.226	0.000	0.939	ND	Xq27.3	—	<i>DRAP1, SMARCA1, HMGB1</i>
<i>miR-494</i>	−0.937	NS	−2.969	0.000	0.989	< .001	14q32.31	—	<i>CCND2, ASL, PMPCA, BCL6</i>

Most relevant miRNAs with significantly differential expression in comparisons of NMZL and RLN, NMZL and FL, and of memory B cells versus GC B cells. Fold changes correspond to the log2 difference between averages. FDR and P values are from the t test (<http://pomelo2.bioinfo.cnio.es/>). To validate the microarray data, all miRNAs in this table were included in the quantitative RT-PCR assay. Only 5 miRNAs had valuable data in the quantitative RT-PCR assay (C_t value > 36): *miR-223*, *miR-29c*, *miR-221*, *let-7f*, and *miR-494*.

NS indicates not significant; —, not applicable; and ND, not determined.

*Chromosomal sites with alterations in the CGH microarray data.

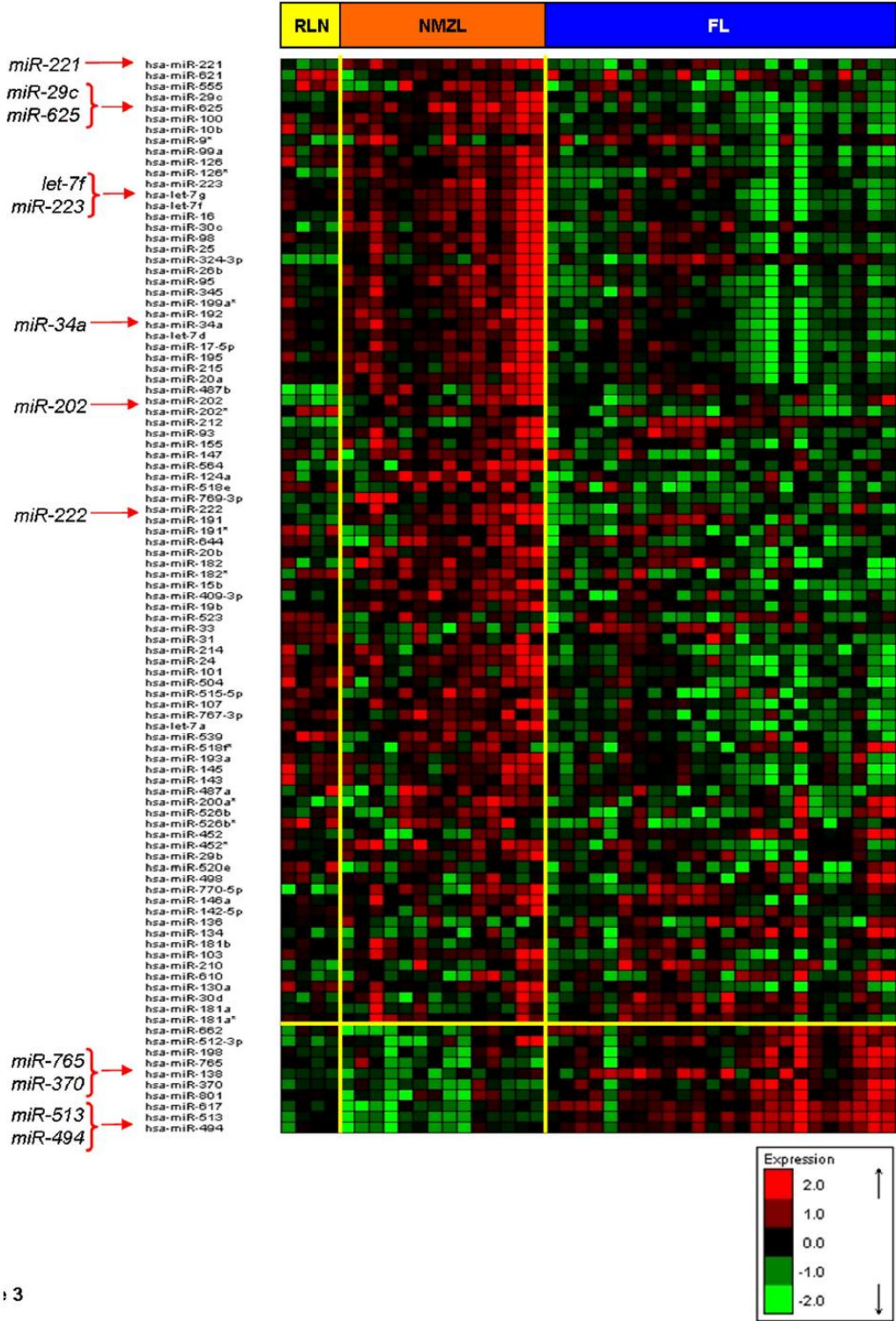


Figure 3. NMZL miRNA signature. Hierarchical clustering of miRNAs with FDR < 0.05 in ANOVA (NMZL vs RLN vs FL) and *t* test comparison. Some important miRNAs in the signature are marked with red arrows. Red and green represent high- and low-level expression, respectively.

survival. *SYK*, *LYN*, *BLK*, and *BLNK* are tyrosine kinases involved in the *BCR* signaling pathway, which is also known to be overexpressed in other MZLs.^{12,13}

In the molecular signature of NMZL, we found a large number of overexpressed genes associated with *NF-κB* signaling pathway, such as *CD74*, *CD81*, *CD82*, *RELA*, and *TRAF4*, thus extending

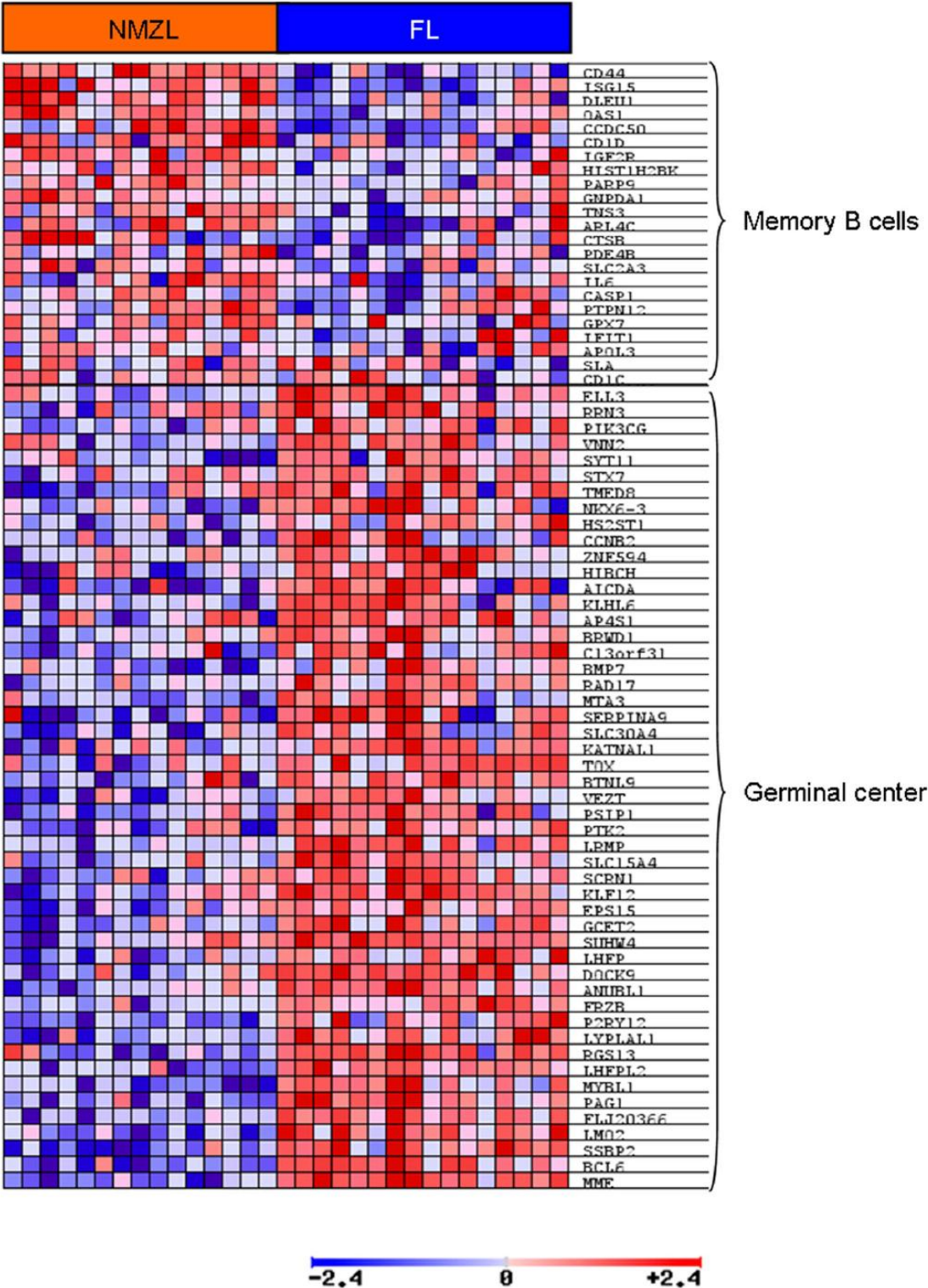


Figure 4. B cell signature expression in NP722 and FL. The GSEA assay revealed upregulation of genes related to the germinal center were overexpressed in FL cases. Red and blue indicate higher and lower expression, respectively.

and confirming the role of this transcription factor in lymphoma pathogenesis.^{7,36} Neither copy number nor expression profiling data in this study confirmed previous findings concerning the frequent loss of *TNFAIP3* in NMZL.⁷

The NMZL cases overexpressed marginal zone-like genes, such as *CD44* and *TACI*, genes of diagnostic value for NMZL, such as *MNDA*, and other relevant genes, including *CHIT1*. Expression of *MNDA* protein was previously evaluated by our group and found to

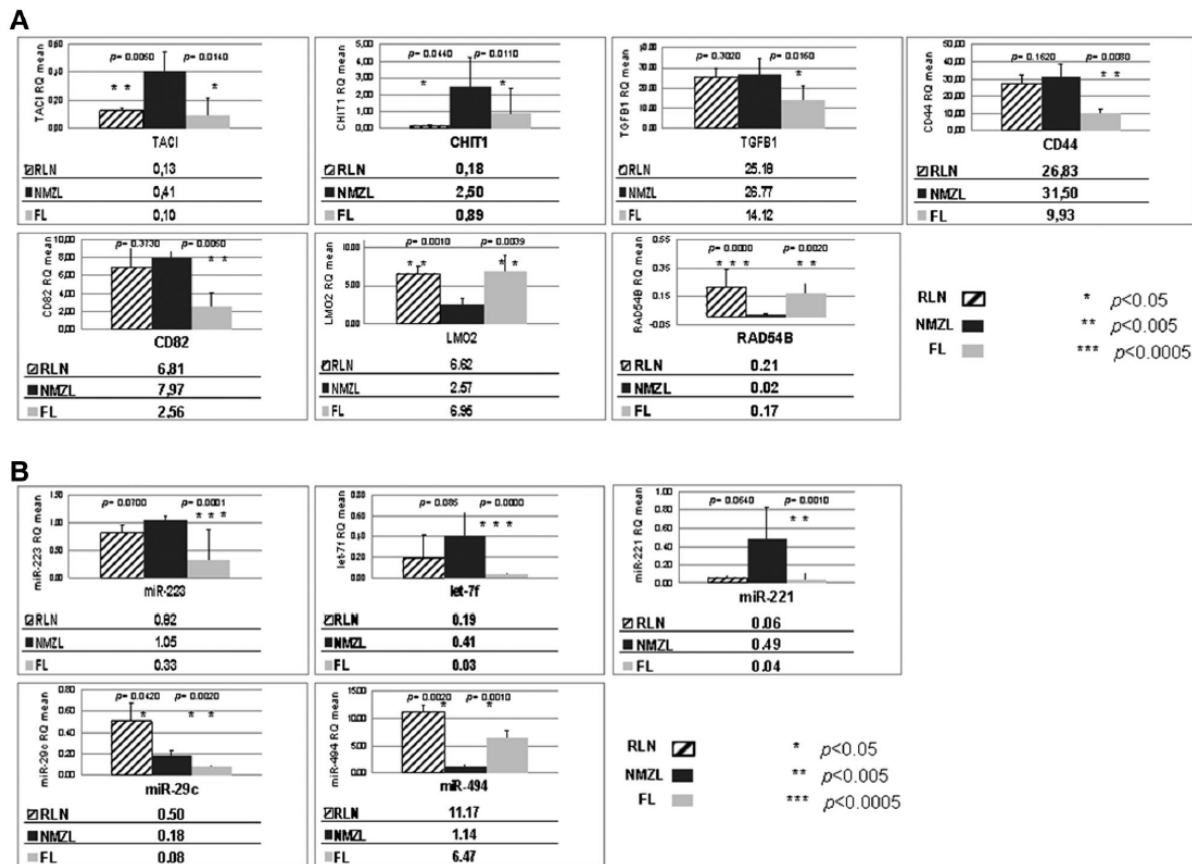


Figure 5. Quantitative RT-PCR assay. (A) Quantitative RT-PCR assay for GEP. (B) Quantitative RT-PCR study for miRNAs. Expression data (RQ mean) of the validated quantitative RT-PCR genes and miRNAs included in the NMZL signature compared with RLN and FL. RQ values are shown below the corresponding graph, and the *t* test (*P*) values are shown on the bars for each comparison. The genes and miRNAs that appear in Tables 2 and 4 (and that are not shown in Figure 5) had no valuable data in the quantitative RT-PCR assay (*C* values > 36): *IKIP* gene and *miR-34a*, *miR-625*, *miR-222*, *miR-202*, *miR-765*, *miR-370*, and *miR-513*. Oblique striped represent RLN cases; black, NMZL cases; and light gray, FL cases.

be significantly higher in NMZL than in FL. The FL samples strongly expressed known GC markers, such as *CD10*, *BCL6*, and *LMO2*. *CD44* is an adhesion molecule expressed in MZLs and other non-Hodgkin lymphomas and is an integral member of the *CD74* receptor complex.^{25,37} The increased expression of chitotriidase-1 or chitinase-1 (*CHIT1*), a marker of macrophages, in the NMZL cases highlights the

essential role of specific subpopulations of accompanying cells in the normal and neoplastic marginal zone.³⁸ A previous independent study found *TACI* protein expression to be higher in NMZL than in FL.³⁹ *TACI*, *CHIT1*, and *TGFB1* showed stronger expression, with microarrays and RT-PCR, in NMZL than FL and could be candidates for novel diagnostic markers in NMZL.

Table 5. Chromosomal band gains and losses by CGH microarray

Band	Imbalance	Frequency, no. (%)	Genes involved*
22q13.32-33	Gain	8/14(67)	<i>CHKB</i> , <i>SBF1</i>
14q32.33	Gain	5/14(36)	—
Xq28	Gain	5/14(36)	<i>TAZ</i>
10q26.13	Gain	4/14(29)	—
16p13.3	Gain	4/14(29)	<i>RHOT2</i> , <i>RAB40C</i>
17q25	Gain	4/14(29)	<i>SYNGR2</i> , <i>WBP2</i>
16q21-24	Gain	3/14(21)	<i>PLCG2</i>
1p36	Gain	2/14(14)	<i>MIB2</i> , <i>SDF4</i>
6p21.33	Gain	2/14(14)	<i>HLA-DMA</i> , <i>HLA-E</i> , <i>HLA-H</i> , <i>HLA-A</i> , <i>HLA-B</i>
6p22.1	Gain	2/14(14)	<i>HIST1H2</i> cluster
8q24.3	Gain	2/14(14)	—
Xp11.23	Gain	2/14(14)	<i>OTUD5</i>
11p15.5	Gain	2/14(14)	<i>IFITM</i> family genes
22q11.21	Loss	2/14(14)	<i>PRAME</i> ; described as a polymorphism resulting from CNV_53983, CNV_35989, and CNV_53720

— indicates not applicable.

*Data are the deregulated genes located in the corresponding cytoband. The deregulated genes belong to the NMZL signature (FDR < 0.05 in the NMZL vs RLN comparison, all NMZL cases included).

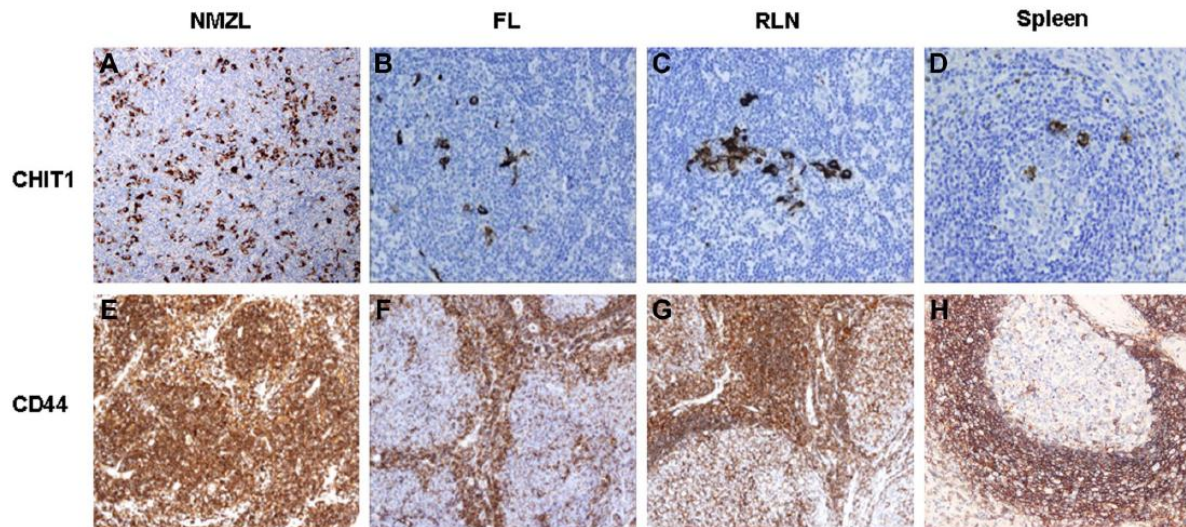


Figure 6. IHC tissue staining. NMZL, FL, and RLN differential expression data revealed by IHC. Examples of cases immunostained for *CHIT1* and *CD44*. All images were acquired using an Olympus A×80 microscope (Olympus) with a magnification 400×, captured with an Olympus DP72 3.0 camera and processed with Cell A software (Olympus Soft Imaging Solutions, Version 3.29).

Data obtained suggest that the differential expression of *miR-221* in NMZL against RLN, and *miR-223*, *let-7f*, and *miR-494* in NMZL versus FL could be of potential diagnostic value. FL and GC cells are distinguished by an increased expression of *LMO2*, and a diminished expression of *miR-223*. *LMO2* targeting by *miR-223* is essential to the regulation of B-cell development.¹⁶ The data here obtained showing *LMO2* down-regulation and increased *miR-223* expression suggest that this relation could also play a role in NMZL. *Let-7* cluster is implicated in multiple molecular processes as cell cycle, apoptosis, and cell proliferation, so this miRNA has been proposed as a putative therapeutic target.²³ *CCND2* is an *miR-494* putative target and is essential for the control of the cell cycle at the G₁ to S transition.⁴⁰

Although the results of this study warrant functional validation, our findings suggest that the miRNA signature is related to the gene expression profile in NMZL in several ways. For instance, the up-regulation of *miR-223* and *miR-221*, which target the GC-related genes *LMO2* and *CD10*, could be partially responsible for the expression of a marginal zone signature. Similarly, the most up-regulated miRNAs in the signature showed a significant positive correlation (Pearson GSEA analysis) with important B-cell pathways, such as *BCR*, *IL2*, *IL6*, *CD40*, *NF-κB*, *TGFB*, and memory B cells. These pathways were also found in the GSEA analysis (NMZL vs RLN comparison), suggesting a significant role for these pathways in NMZL.

Even though deletions of the chromosomal band 6q21-q25 involving the *NF-κB* negative regulator *TNFAIP3* (*A20*) have been described as characteristic cytogenetic abnormalities for MZLs,^{4,6} we were unable to confirm this finding in our series (Figure 6; supplemental Table 5; supplemental Figure 3). This could be a consequence of the small number of cases studied or the resolution of the CGH arrays used for each study.

In conclusion, this analysis shows that the NMZL gene expression profile reproduces the signature of normal marginal zone and memory B cells, identifies *BCR* signaling, interleukins (*IL2*, *IL6*, *IL10*), integrins (*CD40*), and survival pathways (*MAPKs*, *TNF*,

TGFB, *NF-κB*) as the most significant pathways in NMZL pathogenesis, and allows new specific markers (*TACI*, *CHIT1*, *CD44*, *CD82*, *TGFB1*, *miR-223*, *let-7f*, and *miR-221*) to be proposed as a means of distinguishing this lymphoma type from FL. Our study also identifies some possible therapeutic targets, such as *TACI* and *CD74*.

Acknowledgments

The authors thank R. Diaz de Otazu (Vitoria), C. Lobo (San Sebastián), S. Nieto (Madrid), P. Domínguez (Madrid), J. San Juan (Valencia), P. Navarro (Valencia), J. Escobar Jarrío (Asturias), and Laura Cereceda (Spanish National Cancer Research Center Tumor Bank) for kindly providing the cases included in this series and S. Opazo, Y. Ruano, and B. Meléndez (HVS) for their excellent technical help.

This work was supported by the Ministerio de Sanidad y Consumo (RETICS, FIS PI052742, PI081666, PI052800, and INT09/276), Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-03871), the Servicio de Salud de Castilla la Mancha (FISCAM PI2008/31), and the Asociación Española Contra el Cáncer.

Authorship

Contribution: A.J.A. analyzed microarray data, performed research, and wrote the paper; Y.C.-M. and P.A. analyzed data and performed research; C.G.-A. analyzed CGH data and performed research; M.S.-B. performed research and contributed analytical tools; M.S.R.-P. performed research and reviewed cases; S.M.-M. and J.A.-F. performed research and contributed samples; and M.A.P. and M.M. designed the study.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Manuela Mollejo, Avda Barber 30, CP 45004, Toledo, Spain; e-mail: mmollejov@sescam.jccm.es.

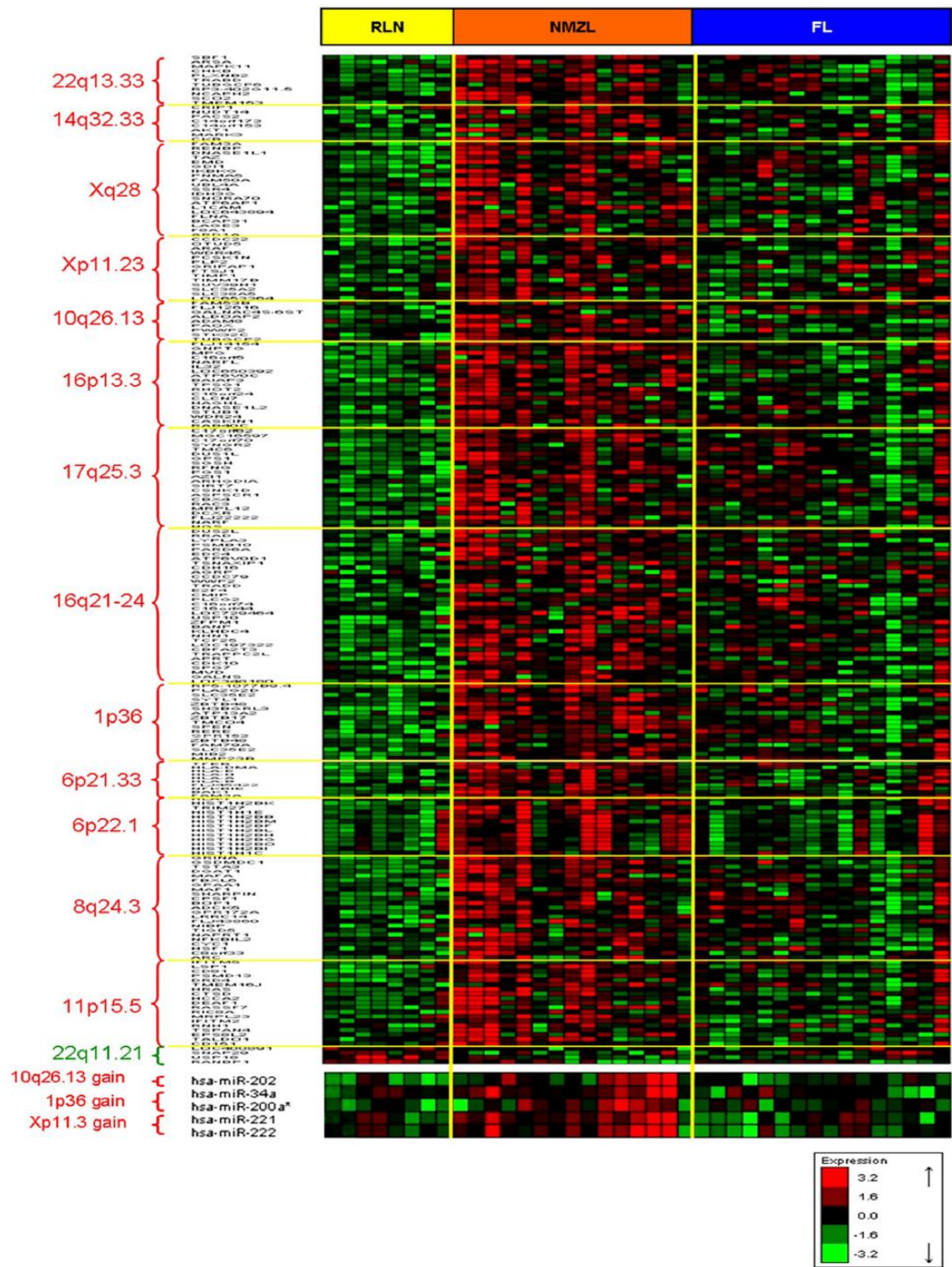


Figure 7. CNA, GEP and miRNA integration data. Hierarchical clustering of signature genes located in the chromosomal bands with copy number aberrations. Red and green represent high- and low-level expression, respectively.

References

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008.

2. Ott G, Katzenberger T, Greiner A, et al. The t(11;18)(q21;q21) chromosome translocation is a

- frequent and specific aberration in low-grade but not high-grade malignant non-Hodgkin's lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-) type. *Cancer Res*. 1997;57(18):3944-3948.
3. Mateo M, Mollejo M, Villuendas R, et al. 7q31-32 allelic loss is a frequent finding in splenic marginal zone lymphoma. *Am J Pathol*. 1999;154(5):1583-1589.
 4. Novak U, Rinaldi A, Kwee I, et al. The NF- κ B negative regulator TNFAIP3 (A20) is inactivated by somatic mutations and genomic deletions in marginal zone lymphomas. *Blood*. 2009;113(20):4918-4921.
 5. Kato M, Sanada M, Kato I, et al. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature*. 2009;459(7247):712-716.
 6. Rinaldi A, Mian M, Chigrinova E, et al. Genome-wide DNA profiling of marginal zone lymphomas identifies subtype-specific lesions with an impact on the clinical outcome. *Blood*. 2011;117(5):1595-1604.
 7. Kanellis G, Roncador G, Arribas A, et al. Identification of MND4 as a new marker for nodal marginal zone lymphoma. *Leukemia*. 2009;23(10):1847-1857.
 8. Piris MA, Rivas C, Morente M, Cruz MA, Rubio C, Oliva H. Monocytoid B-cell lymphoma, a tumour related to the marginal zone. *Histopathology*. 1988;12(4):383-392.
 9. Spencer J, Perry ME, Dunn-Walters DK. Human marginal-zone B cells. *Immunol Today*. 1998;19(9):421-426.
 10. Shen Y, Iqbal J, Xiao L, et al. Distinct gene expression profiles in different B-cell compartments in human peripheral lymphoid organs. *BMC Immunol*. 2004;5:20.
 11. Montes-Moreno S, Roncador G, Maestre L, et al. Gcet1 (centerin), a highly restricted marker for a subset of germinal center-derived lymphomas. *Blood*. 2008;111(1):351-358.
 12. Ruiz-Ballesteros E, Mollejo M, Rodriguez A, et al. Splenic marginal zone lymphoma: proposal of new diagnostic and prognostic markers identified after tissue and cDNA microarray analysis. *Blood*. 2005;106(5):1831-1838.
 13. Huynh MQ, Wacker HH, Wundisch T, et al. Expression profiling reveals specific gene expression signatures in gastric MALT lymphomas. *Leuk Lymphoma*. 2008;49(5):974-983.
 14. Basso K, Sumazin P, Morozov P, et al. Identification of the human mature B cell miRNome. *Immunity*. 2009;30(5):744-752.
 15. Jima DD, Zhang J, Jacobs C, et al. Deep sequencing of the small RNA transcriptome of normal and malignant human B cells identifies hundreds of novel microRNAs. *Blood*. 2010;116(23):e118-e127.
 16. Zhang J, Jima DD, Jacobs C, et al. Patterns of microRNA expression characterize stages of human B-cell differentiation. *Blood*. 2009;113(19):4586-4594.
 17. Rodríguez A, Villuendas R, Yáñez L, et al. Molecular heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia is dependent on BCR signaling: clinical correlation. *Leukemia*. 2007;21(9):1984-1991.
 18. Ach RA, Wang H, Curry B. Measuring microRNAs: comparisons of microarray and quantitative PCR measurements, and of different total RNA prep methods. *BMC Biotechnol*. 2008;8:69.
 19. Ferreira BI, Garcia JF, Suela J, et al. Comparative genome profiling across subtypes of low-grade B-cell lymphoma identifies type-specific and common aberrations that target genes with a role in B-cell neoplasia. *Haematologica*. 2008;93(5):670-679.
 20. Aggarwal M, Sánchez-Beato M, Gómez-López G, et al. Functional signatures identified in B-cell non-Hodgkin lymphoma profiles. *Leuk Lymphoma*. 2009;50(10):1699-1708.
 21. Liva S, Hupé P, Neuvial P, et al. CAPweb: a bioinformatics CGH array Analysis Platform. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(Web Server issue):W477-W481.
 22. Di Lisio L, Gómez-López G, Sánchez-Beato M, et al. Mantle cell lymphoma: transcriptional regulation by microRNAs. *Leukemia*. 2010;24(7):1335-1342.
 23. Barh D, Malhotra R, Ravi B, Sindhurani P. MicroRNA let-7: an emerging next-generation cancer therapeutic. *Curr Oncol*. 2010;17(1):70-80.
 24. Weill JC, Weller S, Reynaud CA. Human marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:267-285.
 25. Chng WJ, Remstein ED, Fonseca R, et al. Gene expression profiling of pulmonary mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma identifies new biologic insights with potential diagnostic and therapeutic applications. *Blood*. 2009;113(3):635-645.
 26. Herreros B, Sanchez-Aguilera A, Piris M. Lymphoma microenvironment: culprit or innocent? *Leukemia*. 2008;22(1):49-58.
 27. Stein R, Mattes M, Cardillo T, et al. CD74: a new candidate target for the immunotherapy of B-cell neoplasms. *Clin Cancer Res*. 2007;13(18):5556-5563.
 28. Starlets D, Gore Y, Binsky I, et al. Cell-surface CD74 initiates a signaling cascade leading to cell proliferation and survival. *Blood*. 2006;107(12):4807-4816.
 29. Mantchev GT, Cortesao CS, Rebrovich M, Cascalho M, Bram RJ. TAC1 is required for efficient plasma cell differentiation in response to T-independent type 2 antigens. *J Immunol*. 2007;179(4):2282-2288.
 30. He B, Chadburn A, Jou E, Schattner EJ, Knowles DM, Cerutti A. Lymphoma B cells evade apoptosis through the TNF family members BAFF/BLyS and APRIL. *J Immunol*. 2004;172(5):3268-3279.
 31. Zandvoort A, Timens W. The dual function of the splenic marginal zone: essential for initiation of anti-Ti-2 responses but also vital in the general first-line defense against blood-borne antigens. *Clin Exp Immunol*. 2002;130(1):4-11.
 32. Kim S, Letterio J. Transforming growth factor-beta signaling in normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia*. 2003;17(9):1731-1737.
 33. Wrzesinski SH, Wan YY, Flavell RA. Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2007;13(18):5262-5270.
 34. Marasca R, Vaccari P, Luppi M, et al. Immunoglobulin gene mutations and frequent use of VH1-69 and VH4-34 segments in hepatitis C virus-positive and hepatitis C virus-negative nodal marginal zone B-cell lymphoma. *Am J Pathol*. 2001;159(1):253-261.
 35. Cocquerel L, Kuo C, Dubuisson J, Levy S. CD81-dependent binding of hepatitis C virus E1E2 heterodimers. *J Virol*. 2003;77(19):10677-10683.
 36. Zarnegar BJ, Wang Y, Mahoney DJ, et al. Noncanonical NF- κ B activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nat Immunol*. 2008;9(12):1371-1378.
 37. Shi X, Leng L, Wang T, et al. CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity*. 2006;25(4):595-606.
 38. Malaguarrera L, Musumeci M, Di Rosa M, Scuto A, Musumeci S. Interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide promote chitotriosidase gene expression in human macrophages. *J Clin Lab Anal*. 2005;19(3):128-132.
 39. Wada K, Maeda K, Tajima K, Kato T, Kobata T, Yamakawa M. Expression of BAFF-R and TAC1 in reactive lymphoid tissues and B-cell lymphomas. *Histopathology*. 2009;54(2):221-232.
 40. Huang W, Chang HY, Fei T, Wu H, Chen YG. GSK3 beta mediates suppression of cyclin D2 expression by tumor suppressor PTEN. *Oncogene*. 2007;26(17):2471-2482.



ANEXO II

ARTICULO II

Alberto J. Arribas; Cristina Gómez-Abad; Margarita Sánchez-Beato; Nerea Martinez; Lorena DiLisio; Felipe Casado; Miguel A. Cruz; Patrocinio Algara; Miguel A. Piris; Manuela Mollejo (2013). "Splenic marginal zone lymphoma: comprehensive analysis of gene expression and miRNA profiling." Modern Pathology (actualmente en fase de edición).

Splenic marginal zone lymphoma: comprehensive analysis of gene expression and miRNA profiling

Alberto J Arribas¹, Cristina Gómez-Abad², Margarita Sánchez-Beato³, Nerea Martínez⁴, Lorena DiLisio⁴, Felipe Casado⁵, Miguel A Cruz⁶, Patrocinio Algara¹, Miguel A Piris⁷ and Manuela Mollejo⁸

¹Genetics Department, Virgen de la Salud Hospital, Toledo, Spain; ²Molecular Pathology Programme, Spanish National Cancer Research Centre, Madrid, Spain; ³Medical Oncology Department, Oncohematology Unit, Fundación Investigación Biomédica HU. Puerta de Hierro-Majadahonda, Madrid, Spain; ⁴Cancer Genomics Laboratory, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla (IFIMAV), Santander, Spain; ⁵Hematology Department, Virgen de la Salud Hospital, Toledo, Spain; ⁶Oncology Department, Virgen de la Salud Hospital, Toledo, Spain; ⁷Pathology Department, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla (IFIMAV), Santander, Spain and ⁸Pathology Department, Virgen de la Salud Hospital, Toledo, Spain

Splenic marginal zone lymphoma is a small B-cell neoplasm whose molecular pathogenesis is still essentially unknown and whose differentiation from other small B-cell lymphomas is hampered by the lack of specific markers. We have analyzed the gene expression and miRNA profiles of 31 splenic marginal zone lymphoma cases. For comparison, 7 spleens with reactive lymphoid hyperplasia, 10 spleens infiltrated by chronic lymphocytic leukemia, 12 spleens with follicular lymphoma, 6 spleens infiltrated by mantle cell lymphoma and 15 lymph nodes infiltrated by nodal marginal zone lymphoma were included. The results were validated by qRT-PCR in an independent series including 77 paraffin-embedded splenic marginal zone lymphomas. The splenic marginal zone lymphoma miRNA signature had deregulated expression of 51 miRNAs. The most highly overexpressed miRNAs were *miR-155*, *miR-21*, *miR-34a*, *miR-193b* and *miR-100*, while the most repressed miRNAs were *miR-377*, *miR-27b*, *miR-145*, *miR-376a* and *miR-424*. MiRNAs located in 14q32-31 were underexpressed in splenic marginal zone lymphoma compared with reactive lymphoid tissues and other B-cell lymphomas. Finally, the gene expression data were integrated with the miRNA profile to identify functional relationships between genes and deregulated miRNAs. Our study reveals miRNAs that are deregulated in splenic marginal zone lymphoma and identifies new candidate diagnostic molecules for splenic marginal zone lymphoma.

Modern Pathology advance online publication, 18 January 2013; doi:10.1038/modpathol.2012.220

Keywords: marginal zone lymphoma; miRNA expression profile; therapeutic target

Splenic marginal zone lymphoma has been recognized by the World Health Organization Lymphoma Classification as a regular entity.¹ Splenic marginal zone lymphoma is an uncommon form of small B-cell neoplasm infiltrating in the spleen, bone marrow and peripheral blood. It accounts for <1% of all lymphoid neoplasms, in which the relative rarity of splenic marginal zone lymphomas is a

significant obstacle to their molecular investigation and identification of specific diagnostic markers. The most common genomic alteration in splenic marginal zone lymphoma is the 7q31 deletion (26–45% of patients)^{2–4} involving the miRNA *miR-29b*^{4,5} and others. Translocations involving the 14q32 band, in which the immunoglobulin heavy chain variable region (IgV_H) locus is located, have been detected infrequently in splenic marginal zone lymphoma⁶ in comparison with other non-Hodgkin lymphomas.⁷ Around half of splenic marginal zone lymphoma patients carry an increased load of IgV_H somatic mutations, which some studies have found to be associated with improved prognosis.⁸ Analysis of gene expression profiles (GEPs) in

Correspondence: Dr AJ Arribas, PhD, Molecular Pathology Research Unit, Hospital Virgen de la Salud, Avda Barber, 30, Toledo, CP 45004, Spain.

E-mail: aarribas@sescam.jccm.es

Received 13 September 2012; revised 12 November 2012; accepted 14 November 2012; published online 18 January 2013

splenic marginal zone lymphoma has revealed the deregulated expression of lymphoma oncogenes, such as *RHOH* and *TCL1A*, identifying clinical subgroups and new therapeutic targets.⁹ Very recently, genome sequencing studies have identified recurrent mutations in the *NOTCH2* gene that seem to be restricted to splenic marginal zone lymphoma among low-grade B-cell disorders.^{10,11} Nevertheless, the molecular pathogenesis of splenic marginal zone lymphoma is still poorly understood, and the data obtained so far suggest that miRNA could play a key role in the pathogenesis of the disease.

Although the diagnostic criteria for the recognition of splenic marginal zone lymphoma are clearly established in splenic tissue, this diagnosis often has to be performed in peripheral blood or bone marrow, where the diagnosis of splenic marginal zone lymphoma is often hindered by the lack of consistent markers differentiating it from chronic lymphocytic leukemia, follicular lymphoma and mantle cell lymphoma.

MiRNAs are 21- to 23-nt-long RNA molecules that regulate mRNA translation and, consequently, the expression of protein-coding genes. More than 1000 miRNAs have been identified in mammals, in which they regulate a range of biological functions, including cell differentiation and proliferation. B-cell differentiation is tightly regulated by miRNAs and the expression of characteristic sets of miRNAs distinguishes specific stages of B-cell differentiation and B-cell lymphoma main tumor types.^{12,13} The miRNA profile of splenic marginal zone lymphoma has been investigated by several groups, who have obtained interesting results related with 7q loss, hepatitis C virus presence or with normal spleen.^{4,5,14,15} Nevertheless, the miRNA changes in splenic marginal zone lymphoma are yet to be comprehensively described. We aimed to carry out an integrated genomics study to improve our understanding of the molecular mechanisms involved in the pathogenesis of splenic marginal zone lymphoma, and to suggest new targets, genes and miRNAs, with diagnostic and therapeutic potential.

Patients and methods

Patients and Tissue Samples

The series included 31 patients with splenic marginal zone lymphoma. Clinical information about these cases was retrieved from medical records, surgical pathology reports and referring clinicians (Table 1). For comparison purposes, we included a set of 35 spleen samples: 7 spleens with reactive lymphoid hyperplasia (reactive spleens), 10 spleens infiltrated by chronic lymphocytic leukemia, 12 spleens with follicular lymphoma and 6 spleens infiltrated by mantle cell lymphoma. To compare the miRNA

expression profile between splenic and nodal marginal zone lymphoma, we included 15 lymph nodes infiltrated by nodal marginal zone lymphoma that were included in a previous study by our group.¹⁶

The main criterion for inclusion was the availability of frozen tissue from the diagnostic specimen in each case. Morphological examination and CD20 immunostaining revealed the cases in which at least 75% of the cells were tumoral in this study.

To validate the levels of miRNA profiles found by microarray analysis, quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) studies were performed with formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from an independent series including 141 cases: 77 splenic marginal zone lymphoma, 16 chronic lymphocytic leukemia, 20 follicular lymphoma, 22 mantle cell lymphoma and 6 reactive spleens.

All cases were provided by the Tumor Bank of the Hospital Virgen de la Salud (BioB-HVS, Toledo, Spain) and the CNIO Tumour Bank (Madrid, Spain). Cases were diagnosed on the basis of morphology, immunophenotypic and molecular findings according to the World Health Organization classification criteria.¹ Research was performed under the supervision of the Institutional Review Board of the HVS, Toledo, Spain.

Selection of B-cell Subsets

B-cell populations were obtained by magnetic cell separation from 5 tumoral patients and 4 healthy donors undergoing routine hematological analysis. The splenic marginal zone lymphoma and non-tumoral B cells were recognized by CD19⁺ expression.

RNA Isolation

For GEP and miRNA hybridization, total RNA was isolated from 59 frozen tumoral blocks and 7 control samples from reactive spleens by TRIzol Reagent (Invitrogen, Paisley, UK) following the manufacturer's recommendations. The quality of the RNA produced was checked by 1% agarose electrophoresis. Cases with poor-quality RNA ($A_{260/280}$ and $A_{260/230}$ ratios <1.8 measured in the NanoDrop; Thermo Scientific, Wilmington, USA) were discarded.

Microarray Procedures: GEP and miRNA Hybridization

RNA for GEP was hybridized on a Whole Human Genome Agilent 4 × 44K Oligonucleotide Microarray (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), as described elsewhere.¹⁷

The miRNA microarray experiments were done using the Agilent Human miRNA Microarray (V1),

Table 1 Clinical characteristics of the splenic marginal zone lymphoma series of patients

Case	Age/sex	IGVH	ID %	7q	Treatment	Progression	Status	OS
1	52/F	VH4-34	100	ND	S	NO	AWD	26
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	70/F	VH3-30	98	ND	S	NO	DOD	25
4	44/F	VH3-30	95.9	ND	S	YES	AWD	24
5	70/M	VH3-30	92.1	ND	S	YES	AWD	64
6	66/F	NR	NR	ND	S	NO	AWD	195
8	73/F	VH1-2/VH3-30	94.7/100	YES	S	NO	AWD	22
10	60/M	VH1-2	99.1	YES	S	NO	AWD	67
11	50/M	VH1-2	98.21	YES	S, CHT	NO	AWD	30
12	55/M	VH1-2	97.3	YES	ND	NO	AWD	81
13	67/M	NR	NR	ND	ND	ND	ND	ND
14	64/F	VH1-2/VH3-8	97.21/96.41	YES	ND	YES	DXT	61
15	66/M	VH4-39/VH3-74	100/100	YES	ND	YES	DXT	57
17	68/M	VH2-70/VH3-30	?/93.5	ND	ND	YES	DXT	78
18	63/M	VH1-18/VH3-3	99.5/100	YES	ND	YES	DXT	10
19	72/F	VH1-2	93.3	YES	ND	NO	AWD	24
20	70/F	VH1-2	96.4	YES	ND	YES	AWD	76
21	65/F	VH4-34	96.35	YES	ND	NO	AWD	53
22	61/M	VH1-2	93.4	NO	ND	YES	AWD	42
23	70/F	VH3-30	95.98	NO	ND	YES	DXT	18
24	63/F	VH6-1	94.5	ND	ND	NO	AWD	13
25	59/M	NR	NR	ND	ND	NO	AWD	34
26	72/F	NR	NR	ND	ND	NO	DOD	54
27	76/F	NR	NR	ND	ND	YES	DXT	92
28	67/F	VH1-2	99.55	YES	ND	YES	AWD	53
29	74/M	VH1-2	100	YES	ND	YES	DXT	3
30	66/F	VH1-2	99.1	YES	ND	YES	DXT	22
31	ND	NR	NR	ND	ND	ND	ND	ND

Abbreviations: F, female; M, male; ND, no data; NR, no rearrangement; ID, identity frequency; S, splenectomy; CHT, chemotherapy; D, dead; DOD, dead of disease; DXT, dead, non-lymphoma related; AWD, alive with disease.

SMZL patients had a median age of 64.7 years, ranging from 44 to 76 years; 54% of them were women.

8 × 15 K (Agilent Technologies). For each tissue sample, 100 ng total RNA were hybridized with the miRNA array and further processed as previously described.¹⁸

Microarray Data Analysis: GEP, miRNA, B-cell Subsets

The background subtraction of GEP microarray data was carried out using GEPAS 4.0 (<http://gepas.bioinfo.cipf.es/>). The data set was normalized by lowess within-array normalization and quantile between-array normalization, and then preprocessed. For miRNA profiling, microarray background subtraction was carried out using the normexp tool available in Bioconductor's limma package (<http://www.bioconductor.org>). To normalize this data set, loess within-array normalization and quartile between-array normalization were performed.¹⁹

We used *t*-tests (<http://pomelo2.bioinfo.cnio.es/>) to compare the expression of the splenic marginal zone lymphoma gene and miRNA signatures with that of the reactive spleens and with the other low-grade B-cell lymphoma types (chronic lymphocytic leukemia, follicular lymphoma and mantle cell lymphoma). In this comparison with other lymphomas, we used a *t*-test to compare splenic

marginal zone lymphoma cases with other lymphoma samples (all treated as a single class). In all these comparisons, the genes and miRNAs with $FDR < 0.05$ were considered significant.

For GEP signatures and miRNA signatures we used values of $FDR < 0.01$ and < 0.05 , respectively, to indicate significance.

The *t*-statistic was calculated in the gene set enrichment analysis (GSEA) (<http://www.broad.mit.edu/gsea/>) to identify the pathways and functional groups enriched in the splenic marginal zone lymphoma signature. The GSEA gene sets used were selected from a curated version of the Biocarta, KEGG and CCG pathway databases, as previously described.²⁰ The gene sets with values of $P < 0.05$ or $FDR < 0.25$ were considered to be enriched and potentially relevant in each case.

MiRNA Target Prediction and miRNA Target Correlation

We followed the previously described procedure²¹ to identify associations between differentially expressed miRNAs ($FDR < 0.05$) and gene expression signatures ($FDR < 0.05$). The GSEA (Pearson correlation) was used to test the enrichment of gene sets related to each corresponding miRNA. Those with values of $P < 0.05$ and $FDR < 0.25$ were

considered to be enriched in each case. Gene target prediction for miRNAs of splenic marginal zone lymphoma signature were obtained using the TargetScan algorithm (Release 5.2) in conjunction with the mir2disease on-line database (<http://www.mir2disease.org/>).

Quantitative Real-Time RT-PCR Analysis

To validate miRNA microarray data we carried out a qRT-PCR assay. Total RNA was extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues sections of an independent patient group following the manufacturer's instructions and using a miRNeasy FFPE Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA).

qRT-PCR experiments were performed on selected miRNAs using TaqMan probes (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), as previously described.^{9,21} The relative degree of change for each miRNA was calculated using the $RQ = 2^{-\Delta Ct}$ method, where $\Delta Ct = (Ct_{miRNA} - Ct_{U6})$, and with an RNU6B endogenous control. Ct values >32 were considered beyond the limit of detection.

Results were analyzed with *t*-tests and one-way ANOVAs (calculated in SPSS v.17.0). miRNAs with values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

miRNA Signature in Splenic Marginal Zone Lymphoma

The miRNA signature in splenic marginal zone lymphoma, comprising the miRNAs differentially expressed in splenic marginal zone lymphoma relative to reactive spleen ($FDR < 0.05$; *t*-test), included 51 miRNAs, 9 of which were overexpressed and 42 were repressed. Within the overexpressed miRNAs we found miRNAs that are involved in B-cell development (eg, *miR-155*) and miRNAs that are deregulated in cancer (eg, *miR-21*, *miR-34a* and *miR-193b*). Among the underexpressed miRNAs we found a high number of miRNAs located in 14q32 (14 of 52 miRNAs, ~27% of the signature), such as *miR-377*, *miR-376a* and *miR-136*, and other relevant miRNAs, like *miR-24*, *miR-27b* (both located in the 9q22 band) and *miR-145* (Table 2; Figure 1).

These findings prompted us to compare the expression of these 14q32 miRNAs of the signature with those found in other lymphomas involving the spleen and nodal marginal zone lymphoma. Interestingly, we found that some of the miRNAs in 14q32 were also significantly repressed in splenic marginal zone lymphoma compared with nodal marginal zone lymphoma. Although the values were not significant, these miRNAs in 14q32 had a lower level of expression in splenic marginal zone lymphoma than chronic lymphocytic leukemia,

follicular lymphoma, and mantle cell lymphoma, with less than onefold change. Ultimately, miRNAs in 14q32 was also repressed in lymph nodes infiltrated by splenic marginal zone lymphoma. No miRNA in 7q appears in the signature, even though *miR-29a* and *miR-29b* repressed in splenic marginal zone lymphoma have been described^{4,5} (Table 2; Figure 2).

Comparison of Splenic Marginal Zone Lymphoma B Cells and Normal B Cells

Taking into account the essential role of the stromal microenvironment in low-grade lymphomas, we took another approach to compare CD19+ B cells isolated from peripheral blood of splenic marginal zone lymphoma patients with those from healthy donors. This enabled us to identify some of the most important miRNAs in the splenic marginal zone lymphoma miRNA signature, both upregulated (*miR-21* and *miR-193b*) and downregulated (*miR-483*, *miR-485-3p* and *miR-328*) (Table 2; Supplementary Table 4). It is of particular note that *miR-29b* and *miR-592*, located at 7q32, are repressed in splenic marginal zone lymphoma B cells compared with healthy donors (Supplementary Table 4).

Integration of miRNA and GEP Data

Although the GEP in splenic marginal zone lymphoma has been previously described,^{9,22,23} as we are now interested in identifying the association between miRNA signature and GEP, the same series used in the miRNAs was also hybridized in GEP. Therefore, we determined the GEP of splenic marginal zone lymphoma relative to reactive spleen using a *t*-test ($FDR < 0.01$) and GSEA software ($P < 0.05$, $FDR < 0.25$). The GEP signature determined in splenic marginal zone lymphoma comprised 753 genes, 194 of them upregulated and 559 repressed. Among the overexpressed genes we found integrins (*CD40*), BCR signaling genes (*SYK*, *BLNK*, *NFATC1*), proliferation-related genes (*MUM1*, *RHOH*, *AIM2*), interleukins (*IL2RA*, *IL7*, *IL6*, *IL21*), anti-apoptotic genes (*BCL2*, *BCL2L10*, *FOXP1*, *BIRC3*), TNF signaling (*CD70*, *TNFRSF9*) and normal marginal zone-related genes (*TACI*, *CD44*, *IL2RA*, *MMP12*). Among the repressed genes we found genes located in 7q (*MEST*, *MET*, *PTN*), others with important functions in B cells (*FCGR3A*, *FCGR3B*, *TNFAIP1*, *TNFAIP2*, *CXCL1*, *CXCL12*), and cell adhesion-related genes (*TGFB1* and *ICAM2*). GEP data in SMZL are shown in Supplementary Table 2.

The GSEA analysis revealed the enrichment of pathways related to cell survival, such as NF- κ B, BAFF signaling and cell cycle, and crucial B-cell pathways, such as memory B-cell-related genes (IgM^+ IgD^+ $CD27^+$), PRDM1 signaling and B-cell receptor genes (Supplementary Table 3).

Analysis of splenic marginal zone lymphoma

AJ Arribas et al

Table 2 MiRNA expression profile in splenic marginal zone lymphoma

miRNA	Cytoband	SMZL vs. RLH		SMZL vs. other lymphomas				SMZL vs. NMZL		B cells	
		FDR	FC	FDR	FC (vs. FL)	FC (vs. CLL)	FC (vs. MCL)	FDR	FC	FDR	FC
hsa-miR-155	21q21.3	0.0001	1.3636	NS	-0.6234	-1.9369	-0.7545	0.0075	0.8876	NS	1.0121
hsa-miR-34a	1p36.22	0.0013	1.281	NS	-0.5482	-0.9769	-1.2861	0.0073	-0.8094	NS (0.0784)	1.392
hsa-miR-100	11q24.1	0.0028	1.1235	NS	-0.7022	-0.9698	-1.4994	0.0012	1.2583	NS	0.4678
hsa-miR-193b	16p13.12	0.0216	1.0595	NS	-0.7951	-0.4008	-1.8453	NS	-0.5294	0.035	1.6673
hsa-miR-330	19q13.32	0.001	0.8598	NS	-0.7498	-0.9477	-1.0091	0.0008	1.0633	NS (0.0539)	1.5244
hsa-miR-21	17q23.2	0.0474	0.8513	0.0049	-1.1313	-1.0129	-1.3443	0	-2.1378	0.0132	1.9599
hsa-miR-26b	2q35	NS	0.2715	0.041	-0.3368	-1.4802	-0.8624	0.0005	-1.0987	0.0329	-1.687
hsa-miR-19b	13q31.3	NS	0.1102	0.0499	-0.3911	-1.1701	-1.3954	0.0006	-0.8801	NS	-1.3312
hsa-miR-660	Xp11.22	NS	0.0263	0.0225	-0.7694	-1.0851	-1.0885	NS	-0.4423	NS	0.6627
hsa-miR-448	Xq23	NS	-0.1061	0.033	-0.762	-1.0343	-0.9973	0.0001	-0.9103	NS	-0.4552
hsa-miR-646	20q13.33	NS	-0.1896	0.033	-0.7637	-1.027	-1.0011	0	-1.3027	NS	-0.2437
hsa-miR-323	14q32.31	NS	-0.3022	0.0447	-0.784	-1.0144	-1.0373	NS	0.2477	NS	0.6538
hsa-miR-567	3q13.2	NS	-0.3514	0.041	-0.8072	-1.0267	-1.0057	0.0315	-0.4447	NS	-0.9589
hsa-miR-589	7p22.1	0.0334	-0.4116	0.0447	-0.7876	-1.0331	-1.0393	NS	-0.3662	NS	-0.1161
hsa-miR-381	14q32.31	0.0022	-0.8884	NS	-0.8363	-1.0544	-1.0361	0.0394	-1.0007	NS	-1.3213
hsa-miR-494	14q32.31	0.0102	-0.9253	NS	-0.1518	-0.3148	-0.4096	NS	0.5589	NS	-0.1063
hsa-miR-382	14q32.31	0.0024	-0.9511	NS	-0.7663	-1.1678	-1.1157	NS	-0.325	NS	0.3914
hsa-miR-154	14q32.31	0.0001	-1.0173	NS	-0.8407	-1.1529	-1.0722	NS	0.2216	NS	-0.6378
hsa-miR-376b	14q32.31	0.0081	-1.0242	NS	-0.8409	-1.1961	-1.0566	0.0047	-1.7553	NS	0.3983
hsa-miR-410	14q32.31	0.0004	-1.0356	NS	-0.8425	-1.071	-1.0584	NS	-0.0101	NS	0.9009
hsa-miR-127	14q32.31	0.004	-1.2176	NS	-0.7677	-1.2333	-1.3005	0.0001	-1.3158	NS	0.7175
hsa-miR-758	14q32.31	0	-1.2837	NS	-0.8111	-1.0247	-0.9909	0.0102	-0.5757	NS	-1.5249
hsa-miR-199a	19p13.2	0.0005	-1.2864	NS	-0.7517	-1.0731	-1.4343	0	-1.1909	NS	0.8821
hsa-miR-376a	14q32.31	0.0009	-1.3704	NS	-0.7113	-1.4976	-1.3556	0.0195	-1.2118	NS	0.846
hsa-miR-136	14q32.31	0.0009	-1.4854	NS	-0.7217	-1.1304	-1.0163	0.0309	0.6645	NS	0.5251
hsa-miR-379	14q32.31	0	-1.4966	NS	-0.8855	-1.0778	-1.0051	NS	0.1304	NS	0.8097
hsa-miR-145	5q32	0.0004	-1.5099	NS	-1.128	-0.8589	-1.3141	0.003	0.9025	NS	0.983
hsa-miR-338	17q25.3	0.0004	-1.6084	NS	-0.9872	-1.1076	-1.0284	0.0007	-1.5367	NS	1.4012
hsa-miR-107	10q23.31	0	-1.6811	NS	-0.5584	-0.8375	-1.1204	0.0157	-0.6025	NS	-0.0679
hsa-miR-27b	9q22.32	0	-1.6847	NS	-0.6594	-1.2939	-0.9624	0.0001	-1.6646	NS	0.7803
hsa-miR-24	9q22.32	0	-1.7407	NS	-0.681	-0.8085	-1.0673	0.0001	-1.2365	NS	0.9969
hsa-miR-377	14q32.31	0	-1.8081	NS	-0.8439	-1.3491	-1.132	0.0037	-1.8887	NS	0.5973
hsa-miR-328	16q22.1	0.0001	-0.9722	NS	-0.1321	-0.0142	0.0541	0.0062	-1.3057	0.0222	-1.809
hsa-miR-485-3p	14q32.31	0.0026	-1.0844	NS	0.2086	0.3138	0.3265	NS	NS	0.0198	-1.8431
hsa-miR-483	11p15.5	0.0059	-1.2378	NS	0.249	0.2958	0.3923	0.0276	-1.5169	0.0084	-2.0841
hsa-miR-339	7p22.3	NS	-0.659	NS	-0.1099	-0.4604	0.8266	NS	NS	0.0059	-2.1783

SMZL vs. RLH columns corresponding to a *t*-test between splenic marginal zone lymphoma and reactive spleen. The data from SMZL vs. Other Lymphomas columns correspond to a *t*-test comparing splenic marginal zone lymphoma with follicular lymphoma, chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma, considered as a single class. SMZL vs. NMZL columns correspond to a *t*-test comparing the two marginal zone classes. The B-cell column corresponds to a *t*-test with B-cell data, obtained from isolated CD19+ B cells from peripheral blood of splenic marginal zone lymphoma patients and healthy donors. FDR is the false discovery rate. FC is the *n*-fold change (log₂ scale) difference between the corresponding averages of classes. NS, not significant.

The GEP data were integrated with the miRNA profile using a TargetScan prediction algorithm and Pearson correlation (GSEA software) to identify functional relationships between genes and deregulated miRNAs. Among the upregulated splenic marginal zone lymphoma genes targeted by down-regulated miRNAs, we found genes relevant in B-cell survival signaling, such as *SYK*, *CD40*, *BCL2*, *CD44*, *AIM2*, *FOXP1*, *MUM1* (*IRF4*) and *RHOH*. Downregulated miRNAs targeting these genes were *miR-145*, *miR-27b*, *miR-376a* and *miR-377* (Tables 2 and 3; Figure 3; Supplementary Table 2).

Conversely, among the downregulated splenic marginal zone lymphoma genes targeted by upregulated miRNAs, we found apoptosis regulators such as *TNFAIP1* and *TNFAIP2* that are predicted

to be regulated by overexpressed miRNAs such as *miR-34a* and *miR-193b*. The overexpressed *miR-155* could regulate the *PLEKHG5* gene, which is involved in the NF- κ B signaling pathway. Similarly, the high level of *miR-21* could contribute to the expression of *TSPYL5*, which is implicated in PTEN-AKT signaling (Tables 2 and 3; Figure 3; Supplementary Table 2).

GSEA was done to determine the enriched pathways related to the most relevant miRNAs in the study. It revealed significant gene sets and pathways with a crucial role in B-cell survival, such as NF- κ B signaling, CD40 signaling, interleukins and inflammatory pathways, cell cycle and memory B-cell genes, to be associated with the expression of *miR-155*, *miR-34a* and *miR-21* (Table 4; Figure 3).

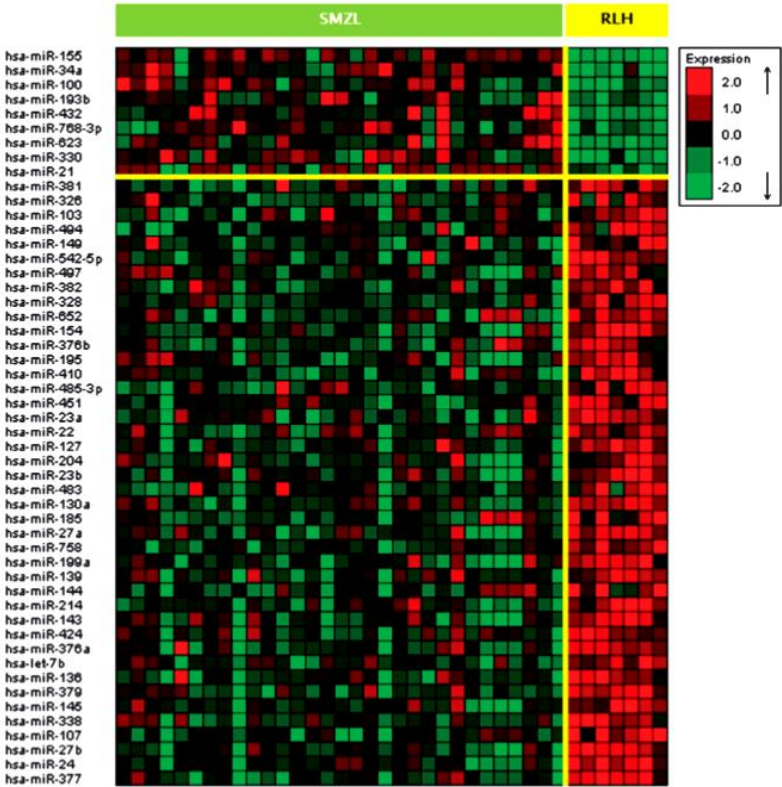


Figure 1 Splenic marginal zone lymphoma miRNA signature. Hierarchical clustering of the complete splenic marginal zone lymphoma miRNA signature: 52 miRNAs with $FDR < 0.05$ and -0.85 - to 0.85 -fold change in a t -test comparison with RLH (<http://pomelo2.bioinfo.cnio.es/>). Red and green indicate high- and low-level expression, respectively. SMZL, splenic marginal zone lymphoma; RLH, reactive lymphoid hyperplasia in the spleen.

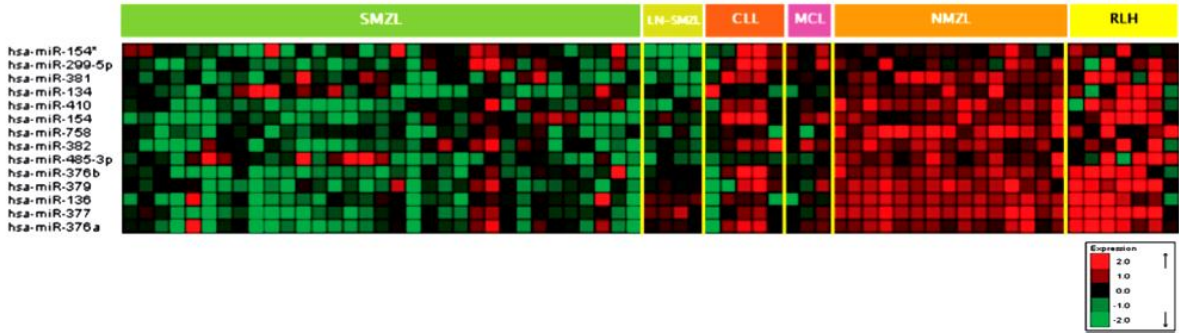


Figure 2 MiRNAs in 14q32. The splenic marginal zone lymphoma miRNA signature contains 14 repressed miRNAs located in 14q32 chromosomal band (27% of the signature). These had a lower level of expression in splenic marginal zone lymphoma than in other classes: lymph node infiltrated by splenic marginal zone lymphoma (LN-SMZL), spleens infiltrated by chronic lymphocytic leukemia (CLL) and by mantle cell lymphoma (MCL), nodal marginal zone lymphoma (NMZL) and non-tumoral spleens (RLH).

Comparison Between Splenic and Nodal Marginal Zone Lymphomas

We also studied the miRNA expression patterns of splenic marginal zone lymphoma relative to nodal marginal zone lymphoma obtaining 44 miRNAs differentially expressed between these subtypes of marginal lymphoma: These included 19 miRNAs

from the splenic marginal zone lymphoma signature, some of which were the most important miRNAs, such as *miR-21*, *miR-155*, *miR-100*, *miR-27b*, *miR-376a* and *miR-377*. Similarly, among the miRNAs with increased expression in nodal marginal zone lymphoma were several already known to be overexpressed in this lymphoma type, such as *miR-199a*¹⁶ (Table 2; Supplementary Table 5).

Table 3 Gene target prediction for the most significant miRNAs in the assay

miRNA Signature	miRNA	FDR	FC	Validated targets (published studies)	Prediction targets (TargetScan)	GEP signature
Upregulated miRNAs	hsa-miR-155	0.0001	1.3636	AGTR1, SAMD1, SMAD5, BCL2 SHIP1, HIF, ETS1, AID, RHOA	PLEKHG5, PTN, RHOBTB1, RAPGEF5, GPD5	Downregulated genes
	hsa-miR-34a	0.0013	1.281	E2F3, CCND1, ARAF, AXL, MEK1, MET, PIK3R2	CCND1, TNFAIP1, CDH4, RAPGEF5	
	hsa-miR-193b	0.0216	1.0595	CCND3, MCM2, MCM5, PLK1, SMAD4, WNT1, JAG1	CCND1, TNFAIP1, PKD2L1, RAPGEF5, CD160	
	hsa-miR-21	0.0474	0.8513	MCL1, CCND1, 14-3-3, SHMT2, AKR1C2	TSPYL5, TGFB1, RAPGEF5, FCGR3B ITGA8, GPD5, CD160	
Downregulated miRNAs	hsa-miR-376a	0.0009	-1.3704	PTEN,TPM1, PDCD4, CDC25A, LRRFP1, WNT1, JAG1	CD44, DLEU1, MUM1, IL2RA , IL7, IRTA4, FOXP1	Upregulated genes
	hsa-miR-145	0.0004	-1.5099	unknown	CD44, NFATC1, DLEU1, MUM1 LIMK1, IL6, CD40, FOXP1	
	hsa-miR-27b	0	-1.6847	FLJ21308, C-MYC	CD44, NFATC1, SYK, PLA2G2D, BCL2L10, DLEU1	
	hsa-miR-377	0	-1.8081	CYP1B1, NOTCH1 NF-κB(lipopolysaccharide-induced activation)	MUM1, LIMK1, TNFRSF9, IRTA1, RHOH, AIM2, FOXP1	
	hsa-miR-217			HO-1 (in combination with hsa-miR-217)	SYK, BCL2L10, BCL2, DLEU1, FCGR2B, FOXP1	

The validated targets column refers to experimentally validated mRNA targets of the respective miRNAs selected from literature while the prediction targets are the predicted mRNAs according to the TargetScan algorithm (Release 5.2) in the mir2disease on-line database (<http://www.mir2disease.org/>). The miRNAs and predicted target genes are those of the splenic marginal zone lymphoma signature.

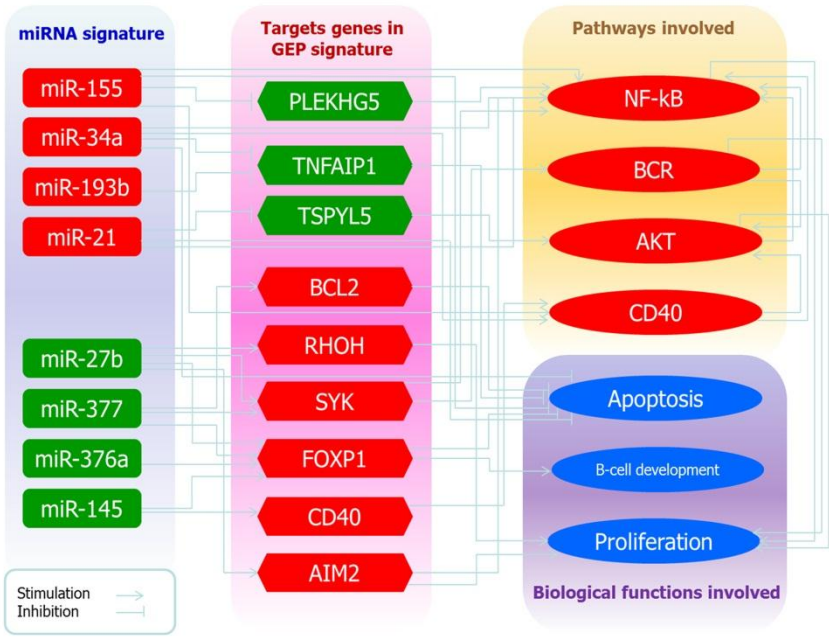


Figure 3 Representation of the most important miRNAs in the signature with connections to pathways and biological functions involved. The connections between upregulated and downregulated miRNAs with corresponding target genes and involved target pathways are shown. The links between miRNAs and genes corresponding to prediction targets by TargetScan algorithm; the junctions within genes and pathways and biological functions are based on literature and on-line databases, while those between miRNAs and pathways and functions reflect positive Pearson correlations from GSEA.

Supervised clustering of the splenic marginal zone lymphoma miRNA signature (SOTA algorithm, Pearson correlation) was used to differentiate between splenic marginal zone lymphoma cases in the spleen, lymph node infiltrated by splenic marginal

zone lymphoma and nodal marginal zone lymphoma. Interestingly, lymph nodes infiltrated by splenic marginal zone lymphoma clustered with the splenic samples and not with the nodal cases (Figure 4).

Splenic Marginal Zone Lymphomas vs. Other Low-Grade B-Cell Lymphomas in the Spleen

To determine those genes and miRNAs with differential expression between SMZL and other low-grade B-cell lymphomas in the spleen (chronic lymphocytic leukemia, follicular lymphoma and mantle cell lymphoma), we carried out a *t*-test, in which we found 357 genes and 9 miRNAs that were significantly deregulated ($FDR < 0.05$). This enabled us to predict targets *in silico*.

The GEP comparison confirmed the stronger expression of *CD200* and *TCL1A* in chronic lymphocytic leukemia, the expression of germinal center markers *BCL6*, *CD10* and *GCTE1* in follicular lymphoma, and of *HDGFRP3* in mantle cell lymphoma. The differentially expressed miRNAs included *miR-21*, *miR-19b* and *miR-660*, all of

which were repressed in splenic marginal zone lymphoma relative to other low-grade B-cell lymphomas and had been previously identified as being deregulated in lymphoma cells.

In splenic marginal zone lymphoma, we found upregulated genes related to normal marginal zone, such as *TACI* (*TNFRSF13B*), interleukins (*IL6*, *IL7R*), relevant kinases, such as *PIP5K2A* and *EIF2AK2*, and genes already described in the splenic marginal zone lymphoma GEP, such as *MMP9*. All significant miRNAs had a lower level of expression in splenic marginal zone lymphoma than in other B-cell lymphomas. Thus, *miR-21* expression in splenic marginal zone lymphoma was a half that in follicular lymphoma and mantle cell lymphoma (Table 2; Figure 5).

Table 4 GSEA Pearson analysis

GSEA gene sets	miR-155 FDR	miR-34a FDR	miR-21 FDR
Memory B cells IgMgDCCD27	0.127	NS	0.174
B-cell-T-cell calcium signaling	0.067	0.024	0.023
NF-κB target gene	0.039	0.016	0.027
NF-κB total pathway	0.123	0.04	0.036
CD40 during GC development	0.065	0.078	NS
Integrin pathway	NS	NS	0.136
IL2 pathway	0.113	0.179	NS
IL2RB pathway	0.077	NS	0.184
IL3 pathway	NS	0.165	NS
IL6 pathway	0.108	0.154	0.094
IL12 pathway	0.129	0.175	0.029
Inflammatory cytokine pathway	NS	0.149	0.151
T-cell cytokine signaling	0.099	0.162	0.025
RHO pathway	0.162	NS	0.137
TNFR2 pathway	0.081	0.018	0.245
JAK-STAT2 pathway	0.122	NS	0.031
JAK-STAT2 receptors	0.111	0.146	0.023
G2 pathway	0.121	NS	0.056
Cell cycle	0.118	0.197	0.149
Death pathway	0.139	0.127	0.138

Significant ($FDR < 0.25$) Pearson correlations associating upregulation of the most relevant overexpressed miRNAs in the assay with the enrichment of crucial B cells pathways and tumorigenesis-involved signaling pathways.

Validation of Microarray Data in an Independent Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Series

Microarray results were validated by a quantitative RT-PCR assay in an independent formalin-fixed, paraffin-embedded series. The set of miRNAs selected for validation by quantitative RT-PCR was a combination of those found to be differentially expressed in the previous analysis, including *miR-21*, *miR-155*, *miR-193b*, *miR-29c*, *miR-27b*, *miR-377*, *miR-145* and *miR-660* (Table 2).

The quantitative RT-PCR analysis confirmed higher expression levels in splenic marginal zone lymphoma versus reactive spleen of *miR-21*, *miR-155* and *miR-193b*, and a lower level of *miR-27b*, *miR-377* and *miR-145*, with significant *P*-values for all miRNAs except for *miR-193b*. The differential expression between splenic marginal zone lymphoma and the other B-cell lymphomas in the spleen was also confirmed for *miR-21* and *miR-660*. Full results are shown in Figure 6.

Discussion

The lack of specific markers in splenic marginal zone lymphoma is an obstacle to its diagnosis,

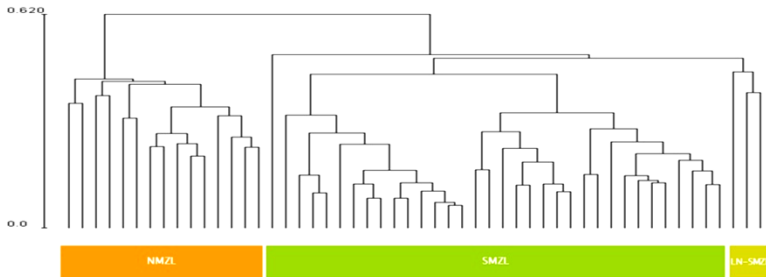


Figure 4 Splenic marginal zone lymphoma miRNA signature. Supervised clustering of splenic marginal zone lymphoma miRNA signature was able to discriminate between splenic marginal zone lymphoma cases in the spleen, lymph node infiltrated by splenic marginal zone lymphoma (LN-SMZL) and nodal marginal zone lymphoma (NMZL). Splenic marginal zone lymphoma cases in the spleen or lymph node appear clustered in comparison with nodal marginal zone lymphoma. The cluster was derived in the CEPAS 4.0 analysis suite (<http://gepas.bioinfo.cipf.es/>) using the SOTA algorithm. Significance was that associated with the Pearson correlation coefficient.

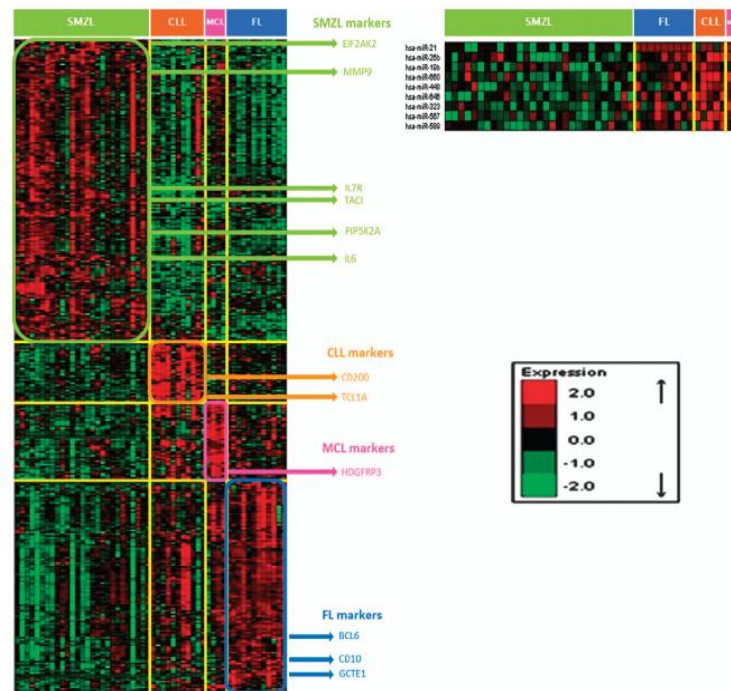


Figure 5 Splenic marginal zone lymphoma expression patterns with respect to other low-grade B-cell lymphomas: miRNAs and GEP. Hierarchical clustering of genes with $FDR < 0.05$ and -1 - to 1 -fold change, and miRNAs with $FDR < 0.05$ and -0.85 - to 0.85 -fold change. Splenic marginal zone lymphoma cases were compared with other lymphoma samples (follicular lymphoma, chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma, all treated as a single class) using a t -test (<http://pomelo2.bioinfo.cnio.es/>). Some relevant genes are indicated with arrows.

especially in those cases where the diagnosis is required to be made from bone marrow or peripheral blood, but without information about the splenic histology. In the present work, we have investigated the GEP and miRNA expression pattern in a splenic marginal zone lymphoma series selected using highly conservative diagnostic criteria. This approach reduced the number of cases that could be analyzed but improved the chance of identifying consistent and specific molecular markers. Cases with intermediate properties or insufficient clinical data were excluded from the analysis.

The close similarity of the gene expression and miRNA profiles in the splenic marginal zone lymphoma series suggests that this disorder is a unique entity and highlights the homogeneity of our data. The miRNA expression profile in splenic marginal zone lymphoma comprises miRNAs regulating important B-cell pathways such as NF- κ B signaling, CD40 signaling, interleukins (IL2, IL6, IL12), inflammatory pathways and memory B-cell-related pathways. These findings confirm the similarity of splenic marginal zone lymphoma with the marginal zone.^{12,24–26} As already described in other low-grade lymphomas,¹⁶ the inflammatory cytokines present in the microenvironment may be involved in the onset and progression of disease contributing to the survival of tumor cells, consistently with what is already known about the

role of the inflammatory microenvironment in this lymphoma type.

Comparison of the miRNA signatures of splenic and nodal marginal lymphomas show that both entities differ in the expression of a group of selected miRNAs. Interestingly, lymph nodes infiltrated by splenic marginal zone lymphoma seem to cluster with spleens infiltrated by splenic marginal zone lymphoma in comparison with nodal marginal zone lymphoma, thus suggesting that splenic marginal zone lymphoma can be distinguished from disseminated nodal marginal zone lymphoma cases. Therefore, although these data require a further validation in a larger series, the two diseases seem represent separate entities, not just different stages of the same disorder.

We found previously described miRNAs forming part of the splenic marginal zone lymphoma signature that were deregulated in this lymphoma type, such as the overexpressed *miR-21*, *miR-34a* and *miR-155*, the repressed *miR-139*,¹⁵ and miRNAs deregulated in other tumors, such as *miR-21*,^{27–30} *miR-34a*³¹ and *miR-193b*.³² The most significant miRNAs observed in the splenic marginal zone lymphoma signature were *miR-155*, *miR-34a*, *miR-193b*, *miR-21*, *miR-377*, *miR-376a*, *miR-27b* and *miR-145*. The expression pattern of these miRNAs has been previously reported in the different B-cell stages, so that *miR-155*, *miR-34a* and *miR-193b* were

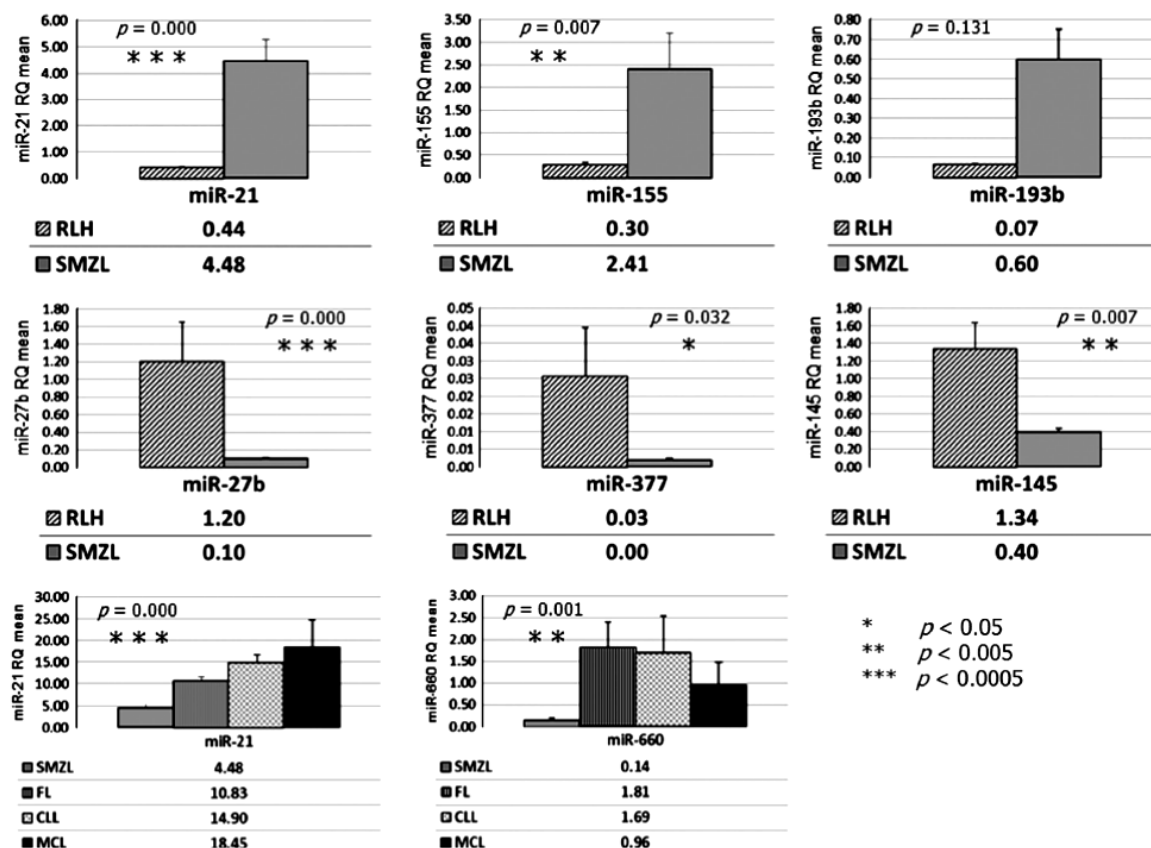


Figure 6 Quantitative RT-PCR assay for miRNAs. Expression data (mean RQ) of the validated quantitative RT-PCR miRNAs included in the splenic marginal zone lymphoma signature compared with reactive spleen and other low-grade B-cell lymphomas (follicular lymphoma, chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma). RQ values are shown below the corresponding graph, and the P -values associated with t -tests are shown on the bars for each comparison. The miRNAs provided valuable data in the quantitative RT-PCR assay with values of $C_t < 32$. Oblique hatching represents reactive spleen (RLH) cases; light gray, splenic marginal zone lymphoma (SMZL) cases; vertical hatching, follicular lymphoma (FL) cases; cross-hatching, chronic lymphocytic leukemia (CLL) cases; and black, mantle cell lymphoma (MCL) cases.

found overexpressed in memory B cells, the converse of what is found in naive B cells.¹² *MIR-21* has a higher level of expression in memory cells than in both naive and germinal center cells,^{12,13,25} *miR-145* is more weakly expressed in memory than in naive B cells,²⁵ and *miR-27b* has recently been described as being downregulated in memory B cells relative to both naive and GC B cells.^{12,25} In addition, *miR-21*, *miR-193b* and *miR-34a* were upregulated in splenic marginal zone lymphoma B cells relative to normal B cells in this series. Thus, the miRNome of splenic marginal zone lymphoma determined in the present study suggests that this tumor is a neoplastic expansion of memory B cells, similar to what our group has observed for nodal marginal zone lymphoma.¹⁶

Our findings confirm the increased expression of *miR-155* in splenic marginal zone lymphoma¹⁵ and other lymphoid neoplasias.^{27–29,33} *MIR-155* is involved in the development of different B-cell differentiation stages³⁴ and helps regulate essential

immune functions.³⁵ Also, *miR-155* targets the *PLEKHG5* gene, which is involved in the NF- κ B signaling pathway,³⁶ and thus *miR-155* could be involved in NF- κ B upregulation in splenic marginal zone lymphoma. The splenic marginal zone lymphoma signature contains others relevant overexpressed miRNAs, such as *miR-34a* and *miR-193b*, which are upregulated in cancer, *miR-34a* in chronic lymphocytic leukemia³¹ and *miR-193b* in malignant melanoma.³² These miRNAs have a predicted target in the *TNFAIP1* gene and could therefore regulate this gene. *TNFAIP1* was repressed in our splenic marginal zone lymphoma series and has been described as an apoptosis regulator,³⁷ so that overexpression of *miR-34a* and *miR-193b* could be involved in regulating apoptosis in splenic marginal zone lymphoma cells, via *TNFAIP1*.

MIR-21 is one of the miRNAs most closely related to lymphoma development, and is overexpressed in chronic lymphocytic leukemia,²⁷ diffuse large B-cell lymphoma,²⁸ acute myeloid leukemia,³⁰ Hodgkin

lymphoma²⁹ and other diseases. The *TSPYL5* gene, which is involved in PTEN-AKT signaling, is a target of *miR-21* and could be regulated by this miRNA. The overexpression of *miR-21* could be responsible for *TSPYL5* suppression, resulting in *PTEN* cellular deregulation, followed by changes in AKT activation. This *TSPYL5* suppression could also determine the expression level of *p21* and subsequently induce deregulation of cell growth.³⁸ Thus, the upregulation of this oncogenic miRNA could contribute to the onset and progression of this lymphoma type.

RHOH and *AIM2*, which have oncogenic activity and are upregulated in splenic marginal zone lymphoma,⁹ could be overexpressed as a consequence of the downregulation of *miR-27b*, as the loss of *miR-145* could allow the upregulation of the splenic marginal zone lymphoma-relevant integrin *CD40*. The relevance of genes regulated by these two miRNAs in splenic marginal zone lymphoma suggests that the loss of *miR-27b* and *miR-145* may contribute to this lymphoma subtype.

The enrichment of relevant pathways involved in B-cell survival, like NF- κ B, CD40 and interleukins, and cancer-related pathways, such as RHO, TNFR and JAK-STAT, is correlated with the upregulation of miRNAs, such as *miR-155*, *miR-21* and *miR-34a* in this series of cases, suggesting that the concerted regulation of these miRNAs could help regulate these pathways and thereby contribute to the survival of lymphoma cells.

Although the miRNA signature of SMZL does not include miRNAs located in 7q32, when we compared the miRNA expression of B cells from splenic marginal zone lymphoma patients with those from healthy donors, we found two repressed miRNAs, *miR-29b* and *miR-592*, located in 7q32. This is consistent with the loss of this band in the splenic subtype of marginal zone lymphoma and with previous observations.^{4,5} Moreover, the expression of miRNAs may be subject to regulatory mechanisms independent of the loss in 7q, such as methylation and histone modification.

Comparison of the miRNA expression pattern in splenic marginal zone lymphoma and other low-grade B-cell lymphomas when the spleen is involved revealed a set of 9 miRNAs with statistically differential expression between the two groups. Of these, 3 were already known to be deregulated in lymphoma cells: *miR-21*, *miR-19b* and *miR-660*. In malignant lymphoma, an miRNA study found genomic upregulation of *miR-19b*,³⁹ while *miR-660* was found to be upregulated in leukemic cells⁴⁰ and *miR-21* has been described in cancer on several occasions.^{27,28,30} Similarly, GEPs from follicular lymphoma, chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma involving the spleen compared with the splenic marginal zone lymphoma GEP showed overexpression of known markers and of previously described genes. The discovery of additional genes in the context of other

lymphomas is consistent with our results, eg, *CD200*⁴¹ and *TCL1A*⁴² in chronic lymphocytic leukemia, *HDGFRP3*⁴³ in mantle cell lymphoma, and germinal center markers such as *BCL6*, *CD10* and *GCTE1* in follicular lymphoma. The genes and miRNAs found in other lymphomas support our data in splenic marginal zone lymphoma, which include those from genes related to normal marginal zone (*TACI*), interleukins (*IL6*, *IL7R*) and several interesting kinases, such as *PIP5K2A* and *EIF2AK2*. *PIP5K2A* is a second messenger that regulates the levels of phosphatidylinositol by increasing AKT activity⁴⁴ and *EIF2AK2* is a kinase that takes part in regulating protein synthesis.⁴⁵ Lastly, we also found genes, such as *MMP9*, that have previously been described in the splenic marginal zone lymphoma GEP.⁹

Our study did not set out to identify the causes of the changes in the expression of the miRNAs identified. The miRNA splenic marginal zone lymphoma signature contains several downregulated miRNAs located in 14q32, including *miR-376a* and *miR-377* among others, which are lost in splenic marginal zone lymphoma compared with non-tumoral spleen and other low-grade B-cell lymphomas. The finding is consistent with the recently published results showing 14q alterations in splenic marginal zone lymphoma,⁶ which are also associated with poor prognosis.⁴⁶ Downregulation of these miRNAs could also be involved in the growth and progression of splenic marginal zone lymphoma through the regulation of oncogenic target genes such as *MUM1*, *FOXP1*, *SYK* and *BCL2*.

In summary, the present study shows that the splenic marginal zone lymphoma miRNA expression profile reproduces the normal marginal zone and memory B-cell program. The most relevant miRNAs of the signature have target genes involved in some of the most important pathways involved in the splenic marginal zone lymphoma pathogenesis, such as NF- κ B and CD40 pathways, and thus could be deregulated through the concerted action of these miRNAs in splenic marginal zone lymphoma.

Acknowledgements

We thank the Tumor Bank of the Hospital Virgen de la Salud (BioB-HVS) and the CNIO Tumour Bank (Madrid) for kindly providing the cases included in this series. We also thank G Gómez (CNIO) and S Opazo (HVS) for their excellent technical help. This study was supported by grants from the Ministerio de Sanidad y Consumo (RETICS, PI081666, INT10/080), the Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-03871), the Servicio de Salud de Castilla la Mancha (FISCAM PI2008/31) and the Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). MSB was supported by a Miguel Servet contract from the Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain.

Disclosure/conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- 1 Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, *et al*. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. International Agency for Research on Cancer (IARC): Lyon; 2008; ch 10: pp 185–187.
- 2 Mateo M, Mollejo M, Villuendas R, *et al*. 7q31-32 allelic loss is a frequent finding in splenic marginal zone lymphoma. *Am J Pathol* 1999;154:1583–1589.
- 3 Rinaldi A, Mian M, Chigrinova E, *et al*. Genome-wide DNA profiling of marginal zone lymphomas identifies subtype-specific lesions with an impact on the clinical outcome. *Blood* 2011;117:1595–1604.
- 4 Watkins AJ, Hamoudi RA, Zeng N, *et al*. An integrated genomic and expression analysis of 7q deletion in splenic marginal zone lymphoma. *PLoS One* 2012;7:e44997.
- 5 Ruiz-Ballesteros E, Mollejo M, Mateo M, *et al*. MicroRNA losses in the frequently deleted region of 7q in SMZL. *Leukemia* 2007;21:2547–2549.
- 6 Baró C, Salido M, Espinet B, *et al*. New chromosomal alterations in a series of 23 splenic marginal zone lymphoma patients revealed by Spectral Karyotyping (SKY). *Leuk Res* 2008;32:727–736.
- 7 Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, *et al*. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *Histopathology* 2000;36:69–86.
- 8 Algara P, Mateo MS, Sanchez-Beato M, *et al*. Analysis of the IgV(H) somatic mutations in splenic marginal zone lymphoma defines a group of unmutated cases with frequent 7q deletion and adverse clinical course. *Blood* 2002;99:1299–1304.
- 9 Ruiz-Ballesteros E, Mollejo M, Rodriguez A, *et al*. Splenic marginal zone lymphoma: proposal of new diagnostic and prognostic markers identified after tissue and cDNA microarray analysis. *Blood* 2005;106:1831–1838.
- 10 Rossi D, Trifonov V, Fangazio M, *et al*. The coding genome of splenic marginal zone lymphoma: activation of NOTCH2 and other pathways regulating marginal zone development. *J Exp Med* 2012;209:1537–1551.
- 11 Kiel MJ, Velusamy T, Betz BL, *et al*. Whole-genome sequencing identifies recurrent somatic NOTCH2 mutations in splenic marginal zone lymphoma. *J Exp Med* 2012;209:1553–1565.
- 12 Basso K, Sumazin P, Morozov P, *et al*. Identification of the human mature B cell miRNome. *Immunity* 2009;30:744–752.
- 13 Jima DD, Zhang J, Jacobs C, *et al*. Deep sequencing of the small RNA transcriptome of normal and malignant human B cells identifies hundreds of novel microRNAs. *Blood* 2010;116:e118–e127.
- 14 Bouteloup M, Verney A, Rachinel N, *et al*. MicroRNA expression profile in splenic marginal zone lymphoma. *Br J Haematol* 2012;156:279–281.
- 15 Peveling-Oberhag J, Crisman G, Schmidt A, *et al*. Dysregulation of global microRNA expression in splenic marginal zone lymphoma and influence of chronic hepatitis C virus infection. *Leukemia* 2012;26:1654–1662.
- 16 Arribas AJ, Campos-Martín Y, Gómez-Abad C, *et al*. Nodal marginal zone lymphoma: gene expression and miRNA profiling identify diagnostic markers and potential therapeutic targets. *Blood* 2012;119:e9–e21.
- 17 Rodríguez A, Villuendas R, Yáñez L, *et al*. Molecular heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia is dependent on BCR signaling: clinical correlation. *Leukemia* 2007;21:1984–1991.
- 18 Ach RA, Wang H, Curry B. Measuring microRNAs: comparisons of microarray and quantitative PCR measurements, and of different total RNA prep methods. *BMC Biotechnol* 2008;8:69.
- 19 Ritchie ME, Silver J, Oshlack A, *et al*. A comparison of background correction methods for two-colour microarrays. *Bioinformatics* 2007;23:2700–2707.
- 20 Aggarwal M, Sánchez-Beato M, Gómez-López G, *et al*. Functional signatures identified in B-cell non-Hodgkin lymphoma profiles. *Leuk Lymphoma* 2009;50:1699–1708.
- 21 Di Lisio L, Gómez-López G, Sánchez-Beato M, *et al*. Mantle cell lymphoma: transcriptional regulation by microRNAs. *Leukemia* 2010;24:1335–1342.
- 22 Troen G, Nygaard V, Jenssen TK, *et al*. Constitutive expression of the AP-1 transcription factors c-jun, junD, junB, and c-fos and the marginal zone B-cell transcription factor Notch2 in splenic marginal zone lymphoma. *J Mol Diagn* 2004;6:297–307.
- 23 Thieblemont C, Coiffier B. Management of marginal zone lymphomas. *Curr Treat Options Oncol* 2006;7:213–222.
- 24 Shen Y, Iqbal J, Xiao L, *et al*. Distinct gene expression profiles in different B-cell compartments in human peripheral lymphoid organs. *BMC Immunol* 2004;5:20.
- 25 Tan LP, Wang M, Robertus JL, *et al*. miRNA profiling of B-cell subsets: specific miRNA profile for germinal center B cells with variation between centroblasts and centrocytes. *Lab Invest* 2009;89:708–716.
- 26 Weill JC, Weller S, Reynaud CA. Human marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* 2009;27:267–285.
- 27 Fulci V, Chiaretti S, Goldoni M, *et al*. Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007;109:4944–4951.
- 28 Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, *et al*. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2008;141:672–675.
- 29 Van Vlierberghe P, De Weert A, Mestdagh P, *et al*. Comparison of miRNA profiles of microdissected Hodgkin/Reed-Sternberg cells and Hodgkin cell lines versus CD77+ B-cells reveals a distinct subset of differentially expressed miRNAs. *Br J Haematol* 2009;147:686–690.
- 30 Mi S, Lu J, Sun M, *et al*. MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:19971–19976.
- 31 Asslaber D, Piñón JD, Seyfried I, *et al*. microRNA-34a expression correlates with MDM2 SNP309 polymorphism and treatment-free survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2010;115:4191–4197.
- 32 Caramuta S, Egyházi S, Rodolfo M, *et al*. MicroRNA expression profiles associated with mutational status and survival in malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 2010;130:2062–2070.

- 33 Roehle A, Hoefig KP, Repsilber D, *et al*. MicroRNA signatures characterize diffuse large B-cell lymphomas and follicular lymphomas. *Br J Haematol* 2008;142: 732–744.
- 34 Thai TH, Calado DP, Casola S, *et al*. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science* 2007;316:604–608.
- 35 Pauley KM, Cha S, Chan EK. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2009;32: 189–194.
- 36 Matsuda A, Suzuki Y, Honda G, *et al*. Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene* 2003;22:3307–3318.
- 37 Kim DM, Chung KS, Choi SJ, *et al*. RhoB induces apoptosis via direct interaction with TNFAIP1 in HeLa cells. *Int J Cancer* 2009;125:2520–2527.
- 38 Kim EJ, Lee SY, Kim TR, *et al*. TSPYL5 is involved in cell growth and the resistance to radiation in A549 cells via the regulation of p21(WAF1/Cip1) and PTEN/AKT pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;392:448–453.
- 39 Tagawa H, Seto M. A microRNA cluster as a target of genomic amplification in malignant lymphoma. *Leukemia* 2005;19:2013–2016.
- 40 Pizzimenti S, Ferracin M, Sabbioni S, *et al*. MicroRNA expression changes during human leukemic HL-60 cell differentiation induced by 4-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 2009;46:282–288.
- 41 El Desoukey NA, Afify RA, Amin DG, *et al*. CD200 expression in B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *J Investig Med* 2012;60:56–61.
- 42 Calin GA, Pekarsky Y, Croce CM. The role of microRNA and other non-coding RNA in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007;20:425–437.
- 43 Ortega-Paino E, Fransson J, Ek S, *et al*. Functionally associated targets in mantle cell lymphoma as defined by DNA microarrays and RNA interference. *Blood* 2008;111:1617–1624.
- 44 Wilcox A, Hinchliffe KA. Regulation of extranuclear PtdIns5P production by phosphatidylinositol phosphate 4-kinase 2alpha. *FEBS Lett* 2008;582: 1391–1394.
- 45 Yoon CH, Miah MA, Kim KP, *et al*. New Cdc2 Tyr 4 phosphorylation by dsRNA-activated protein kinase triggers Cdc2 polyubiquitination and G2 arrest under genotoxic stresses. *EMBO Rep* 2010;11:393–399.
- 46 Salido M, Baró C, Oscier D, *et al*. Cytogenetic aberrations and their prognostic value in a series of 330 splenic marginal zone B-cell lymphomas: a multicenter study of the Splenic B-Cell Lymphoma Group. *Blood* 2010;116:1479–1488.

Supplementary Information accompanies the paper on Modern Pathology website (<http://www.nature.com/modpathol>)



ARTÍCULOS PUBLICADOS

RELACIÓN DE ARTÍCULOS PUBLICADOS

1. Kanellis G, Roncador G, **Arribas A**, Mollejo M, Montes-Moreno S, Maestre L, Campos-Martín Y, Ríos González JL, Martínez Torrecuadrada JL, Sánchez Verde L, Pajares R, Cigudosa JC, Martín MC y Piris MA. "**Identification of MNDA as a new marker for Nodal Marginal Zone Lymphoma**". *Leukemia* 2009 **23**(10):1847-57.
2. Manuela Mollejo, María S. Rodríguez-Pinilla, M, Santiago Montes-Moreno, Patrocinio Algara, Ahmet Dogan, Juan C. Cigudosa, Rocío Juárez, Teresa Flores, Jerónimo Forteza, **Alberto Arribas**, Miguel A. Piris. "**Splenic Follicular Lymphoma. Clinicopathologic Characteristics of a Series of 32 Cases**". *Am J Surg Pathol* 2009 **33**(5):730-8.
3. Piris MA, **Arribas A**, Mollejo M. "**Marginal Zone Lymphoma**". *Semin Diagn Pathol* 2011 **28**(2):135-145.

